รายงานการวิจัย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเปลือกแตงโม โดยใช้เชื้อ *Komagataeibacter* sp PAP1

Studied on Optimization of Bacterial Cellulose Production from Watermelon Rind by *Komagataeibacter* sp. PAP1

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2561
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานวิจัย การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเปลือกแตงโม โดยใช้เชื้อ *Komagataeibacter* sp PAP1

แหล่งเงิน (ระบุแหล่งทุน) เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ 2561

จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2560 ถึง กันยายน 2561

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด

รศ.ดวงใจ โอชัยกุล คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเปลือกแตงโมโดยเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโม โดยใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 5 ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.0 และไม่เติมเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด 5.30±0.25 กรัมต่อลิตร และกระดาษที่ได้จากแบคทีเรียเซลลูโลสในอาหารที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสมมีผลผลิตเซลลูโลส 6.44±0.18 กรัมต่อลิตร ภายหลังการการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน และศึกษาคุณสมบัติเชิงกลพบว่ามีค่าความแข็งแรงดึง 98.79 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร ค่ายืด ณ จุดขาดร้อยละ 7.87 และมีค่ามอดูลัสของยังส์ 812.60 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร จากนั้นเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่ามีลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสไม่แตกต่างกัน

คำสำคัญ : เซลลูโลสจากแบคทีเรีย เปลือกแตงโม *Gluconacetobactor nataicola*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title Studied on Optimization of Bacterial Cellulose Production from Watermelon Rind by *Komagataeibacter* sp. PAP1

Researcher Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul
Department of Biology, Faculty of Science,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Abstract

The studied on optimization of bacterial cellulose production from watermelon rind by *Komagataeibacter* PAP1. The optimal conditions (for BC production) was 5% mannitol as carbon source, 0.1% di-ammonuimphosphate as nitrogen source, pH 5.0 and 0% ethanol. Optimal medium based on watermelon rind supplement of coconut medium, After incubated in static condition at 30°C for 7 days. The highest cellulose yields is 5.30±0.25 g/L. After day 10 of cultivation the BC papers produced from optimal conditions obtain cellulose yields 6.44±0.18 g/L. The physical properties of the BC papers, such as Tensile strength were figured out as 98.79 Pa, Elongation at break as 7.87% and Young's modulus as 812.60 Pa. Furthermore, the SEM micrographs of BC paper from both medium were similar.

Keywords : bacterial cellulose, watermelon rind, *Gluconacetobacter nataicola*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของนักศึกษาระดับปริญญาตรี ชั้นปีที่ 4 สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในการทำวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบรายได้คณะฯ ประจำปีงบประมาณ 2561

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 ลักษณะของเชื้อ *Acetobacter* 3
2.2 เมแทบอลิซึมของคาร์บอนใน *Acetobacter xylinum* 5
2.3 กระบวนการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* 5
2.4 เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (Bacterial cellulose) 8
2.4.1 ลักษณะของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย 11
2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส 12
2.5.1 น้ำมะพร้าวและแหล่งคาร์บอน 12
2.5.2 แหล่งไนโตรเจน 13
2.5.3 ความเป็นกรด-ด่าง 14
2.5.4 อุณหภูมิ 14
2.5.5 ออกซิเจน 15
2.5.6 เอทานอล และกรดอะซิติก 16
2.6 การนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาประยุกต์ใช้ 17
2.6.1 การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ 17
2.6.2 การประยุกต์ทางอาหาร 18
2.6.3 การผลิตกระดาษ 18
2.6.4 การประยุกต์ใช้ทางด้านอื่นๆ 20
2.7 แตงโม (Watermelon) 20
2.7.1 แตงโมพันธุ์กินรี 21

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 22
2.8.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย 22
2.8.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตกระดาษจากเซลลูโลสจากแบคทีเรีย 25

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 27
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ 27
3.1.2 วัตถุดิบ 27
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 27
3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 27
3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ 28
3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงาน 29
3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ 29
3.2.2 การเตรียมน้ำเปลือกแตงโม 29
3.2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส 29
จากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1
3.2.3.1 อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโม 29
3.2.3.2 อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบ 30
ของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว
3.2.3.3 อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบ 30
ของอาหารมาตรฐาน HS
3.2.3.4 การเก็บเกี่ยวและทำเซลลูโลสให้บริสุทธิ์ 30
3.2.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ 31
Komagataeibacter sp. PAP1 ในสูตรอาหารที่คัดเลือกไว้
3.2.4.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอน 31
3.2.4.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจน 31
3.2.4.3 ศึกษาพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ 32
3.2.4.4 ศึกษาการเติมเอทานอล 32
3.2.4.5 การวิเคราะห์ 32
3.2.4.5.1 ผลผลิตเซลลูโลส 32
3.2.4.5.2 ความหนาของแผ่นเซลลูโลส 33
3.2.4.5.2 พีเอชของน้ำหมัก 33

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 36
4.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Komagataeibacter sp. PAP1
4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในสูตรอาหารที่เหมาะสม 38
4.2.1 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอน 38
4.2.2 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจน 41
4.2.3 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 43
4.2.4 ผลการศึกษาการเติมเอทานอล 45
4.3 เปรียบเทียบการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในอาหารที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสมกับอาหารคัดเลือกก่อนศึกษาสภาวะที่เหมาะสม 48
4.4 การผลิตกระดาษจากเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสม 50
4.5 ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส 52
4.6 ผลการศึกษาสมบัติเชิงกลของกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 52

บทที่ 5 สรุปผลวิจัย และข้อเสนอแนะ 54
เอกสารอ้างอิง 56
ภาคผนวก 61
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 62
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์คุณภาพของกระดาษ 63
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ทางสถิติ 65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงคุณค่าทางอาหารของแตงโม	22
4.1	พีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหาร 3 สูตร ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	36
4.2	แสดงผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเปลือกแตงโมด้วยวิธี Proximate analysis	37
4.3	ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อพีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	39
4.4	ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อพีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	41
4.5	ผลของการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมักที่มีผลต่อพีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	44
4.6	ผลของการใช้เอทานอลความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อพีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	46
4.7	แสดงพีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ที่ได้จากการหมักในสูตรอาหารที่คัดเลือกและสูตรอาหารที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสม ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	49
4.8	แสดงพีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในสูตรอาหารที่คัดเลือกและสูตรอาหารที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสม ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน	51
4.9	ค่าความแข็งแรงดึง ค่ามอดูลัสของยังส์ และค่ายืด ณ จุดขาดของกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสมและอาหารที่คัดเลือกก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะ	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ค-1	วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของพีเอชของน้ำหมักของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหาร 3 สูตร ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	65
ค-2	วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของความหนาของเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหาร 3 สูตร ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	67
ค-3	วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหาร 3 สูตร ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	68
ค-4	วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของพีเอชของน้ำหมักของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	70
ค-5	วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของความหนาของเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	71
ค-6	วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันภายหลัง การบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	73
ค-7	วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของพีเอชของน้ำหมักของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	74
ค-8	วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของความหนาของแผ่นเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค-9 วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 77

ค-10 วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของพีเอชของน้ำหมักของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 โดยแปรผันพีเอชเริ่มต้นต่างๆของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน 79

ค-11 วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของความหนาของเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 โดยแปรผันพีเอชเริ่มต้นต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน 80

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ค-12 วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 โดยแปรผันพีเอชเริ่มต้นต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 82

ค-13 วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของพีเอชของน้ำหมักของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 โดยแปรผันการเติมเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 83

ค-14 วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของความหนาของเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 โดยแปรผันการเติมเอทานอลความเข้มข้นต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน 85

ค-15 วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 โดยแปรผันการเติมเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 86

ค-16 วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของพีเอชของน้ำหมักของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสมภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค-17 วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของความหนา ของเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสมภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 89

ค-18 วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสมภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 90

ค-19 วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของพีเอช ของน้ำหมักของเชื้อ *Komagataeibacter* PAP1 ที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสมภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน 91

ค-20 วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของความหนา ของเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* PAP1 ที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสมภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน 92

ค-21 วิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* PAP1 ที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสมภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน 93

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 แสดงลักษณะของเชื้อ *Acetobacter xylinum* 4

2.2 แสดงวิถีเมแทบอลิซึมของ *Acetobacter xylinum* 6

2.3 แสดงแบบจำลองการควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลสของ *A. xylinum* 7

2.4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส 9

2.5 แสดงลักษณะของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย (ซ้าย) เปรียบเทียบเซลลูโลสจากพืช (ขวา) 9

2.6 แสดงภาพ SEM ของแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* ในสภาวะนิ่ง (ซ้าย) และเซลล์แบคทีเรียที่ถูกพันยึดติดด้วยเซลลูโลส (ขวา) 10

2.7 แสดงโครงสร้างของเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่ยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน 10

2.8 แตงโมพันธุ์กินรี 20

4.1 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* PAP1 ในอาหาร 3 สูตร ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 38

4.2 ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* PAP1 ในอาหาร 3 สูตร ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากการใช้แหล่งคาร์บอน 5 ชนิด ในการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 40

4.4 ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการใช้แหล่งคาร์บอน 5 ชนิด ในการเลี้ยงเชื้อ *G.nataicola* PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 40

4.5 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากการใช้แหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด ในการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 42

4.6 ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการใช้แหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด ในการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 43

4.7 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากการปรับพีเอชเริ่มต้นต่างๆของอาหาร ในการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 44

4.8 ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการปรับพีเอชเริ่มต้นต่างๆของอาหารในการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 45

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.9 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากการเติมเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ ในการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 47

4.10 ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการเติมเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ ในการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 47

4.11 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* PAP1 ในอาหารสูตรอาหารที่คัดเลือก และสูตรอาหารที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสมภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.12 ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* PAP1 ในสูตรอาหารที่คัดเลือกก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และสูตรอาหารที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสม ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 50

4.13 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* PAP1 ในอาหาร (a) ชุดควบคุม และ (b) สภาวะที่เหมาะสม ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน 51

4.14 แสดงผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* PAP1 ในอาหารชุดควบคุม และสภาวะที่เหมาะสมภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน 52

4.15 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสูตรอาหารที่คัดเลือกก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (ชุดควบคุม) และสูตรอาหารที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสมที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีการเพาะปลูกผลไม้หลากหลายชนิด ทำให้มีผลผลิตทางการเกษตรให้เลือกบริโภคมากมาย แตงโม (Watermelon) ชื่อทางวิทยาศาสตร์ : *Citrullus lanatus* มีชื่อเรียกสามัญหลายอย่างตามแต่ละท้องถิ่น เช่น บักโม บะเต้า แตงจีน เป็นต้น สำหรับประเทศไทยนั้นการปลูกแตงโมจะมีอยู่ทั่วทุกภาค สามารถปลูกได้ทุกฤดูกาล แตงโมเป็นผลไม้ที่มีน้ำประกอบอยู่ในปริมาณมาก จึงมีคุณสมบัติเย็น รับประทานแล้วหวานชื่นใจ สำหรับประโยชน์ของแตงโม เช่น ช่วยลดอาการไข้ คอแห้ง รักษาแผลในปาก เป็นต้น และยังเป็นผลไม้เพื่อสุขภาพอีกด้วย เพราะอุดมไปด้วยวิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด เช่น วิตามินเอ วิตามินซี แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส จากประโยชน์ที่ได้กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้แตงโมได้รับความนิยมในการนำมาบริโภค โดยทั่วไปจะเลือกบริโภคส่วนที่เป็นเนื้อแตงโม จึงทำให้มีเปลือกแตงโมเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก ด้วยเหตุผลนี้จึงได้นำเปลือกแตงโมงมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเซลลูโลสไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เช่น นำมารับประทานเป็นอาหาร ประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ กระดาษลำโพง ผลิตภัณฑ์กระดาษ ซึ่งการนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตกระดาษได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากกระดาษโดยทั่วไปเป็นวัสดุที่ผลิตมาจากเส้นใยเซลลูโลสของพืช ในการผลิตกระดาษนั้นต้องใช้ต้นไม้เป็นจำนวนมากในการผลิต และระยะเวลาในการปลูกต้นไม้ที่จะนำมาผลิตกระดาษนั้นใช้เวลานาน จากการนำต้นไม้มาผลิตกระดาษทำให้มีผลกระทบต่อจำนวนต้นไม้ที่ลดลงมีผลทำให้เกิดสภาวะโลกร้อนได้ ซึ่งการผลิตกระดาษจากเซลลูโลสจากแบคทีเรียทำให้ช่วยลดการใช้ต้นไม้ในการผลิตกระดาษ และลดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นได้ ซึ่งเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียจะมีเส้นใยขนาดเล็กกว่าเส้นใยของพืช มีคุณสมบัติอุ้มน้ำได้มากกว่าพืชอื่นๆ และมีลักษณะประสานกันคล้ายร่างแห ซึ่งเหมาะที่จะนำมาผลิตกระดาษ กระดาษที่ผลิตจากเซลลูโลสจากแบคทีเรียเป็นกระดาษที่มีคุณภาพดี และเหมาะสมนำไปใช้งาน

โครงงานพิเศษนี้จึงได้สนใจศึกษาการนำเปลือกแตงโมพันธุ์กินรีมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียเพื่อนำไปประยุกต์ในการผลิตกระดาษ โดยจะศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย เช่น สูตรอาหาร แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น และความเข้มข้นเอทานอล เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสให้ได้ผลผลิตสูงสุดและผลิตแผ่นเซลลูโลสที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตกระดาษต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อนำเปลือกแตงโมมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยใช้เชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากมะละกอในประเทศไทย (Suwanposri และคณะ, 2012) โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อนี้ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเข้มข้นของเอทานอล จากนั้นผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในสภาวะที่เหมาะสมข้างต้น นำเซลลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษ รวมทั้งศึกษาสมบัติของกระดาษที่ได้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

คั้นน้ำจากเปลือกแตงโม จากนั้นนำมาเตรียมอาหาร 3 สูตร ดังนี้ 1) อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโม 2) อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว และ 3) อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารมาตรฐาน HS เพื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1ในการผลิตเซลลูโลส เพื่อหาสูตรอาหารที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงที่สุด จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อชนิดนี้ในสภาวะอาหารที่คัดเลือก โดยศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น และความเข้มข้นเอทานอลหมักเซลลูโลสในสภาวะที่เหมาะสม นำเซลลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษ และศึกษาสมบัติของกระดาษที่ได้ เช่น สมบัติเชิงกล ดูลักษณะโครงสร้างเส้นใย โดยเปรียบเทียบกับกระดาษเซลลูโลสที่ใช้วัตถุดิบชนิดอื่น

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. การเตรียมหัวเชื้อ

นำหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1จาก Cryotube ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ในอาหารเหลว HS ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในขวดแก้วเล็ก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ทำการ Streak plate ลงบนอาหารแข็ง HS เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวใส่ในอาหารเหลว HS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมา Streak ให้เต็มจานอาหารแข็ง HS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

เตรียมอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ซึ่งประกอบด้วย น้ำมะพร้าวแก่ น้ำตาลซูโครส ร้อยละ 5 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1.0 ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1จำนวน 1 เพลทต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จะได้หัวเชื้อวุ้นมะพร้าว

2. การเตรียมน้ำเปลือกแตงโม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเปลือกแตงโมมาล้างน้ำให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และปั่นโดยใช้โถปั่นไฟฟ้า จากนั้นกรองเอาส่วนน้ำออกมาโดยใช้ผ้าขาวบาง นำส่วนน้ำเปลือกแตงโมมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1

3.1 อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโม

นำน้ำเปลือกแตงโมมาปรับพีเอชเริ่มต้นให้เป็น 6.0 แบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที รอให้เย็นจากนั้นเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1ที่ได้จากข้อ 14.1 ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.2 อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว

นำน้ำเปลือกแตงโมที่มีการเติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ดังนี้ น้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 และกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1.0 ปรับพีเอชเริ่มต้นให้เป็น 6.0 ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บเกี่ยวผลผลิตเซลลูโลส

3.3 อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารมาตรฐาน HS

นำน้ำเปลือกแตงโมที่มีการเติมส่วนประกอบของอาหารสูตร HS ดังนี้ น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2 เปปโตนร้อยละ 0.5 ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.27 และกรดซิตริกร้อยละ 0.12 ปรับพีเอชเริ่มต้นให้เป็น 6.0 ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บเกี่ยวผลผลิตเซลลูโลส

3.4 การเก็บเกี่ยวและทำเซลลูโลสให้บริสุทธิ์

เมื่อครบ 7 วันนำเซลลูโลสออกจากอาหารหมักแต่ละสูตร นำมาต้มด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียออก (Bae และคณะ, 2004) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นหลายครั้ง เพื่อกำจัดเอาสารละลายด่างออกจากแผ่นเซลลูโลส จนกระทั่งแผ่นเซลลูโลสมีสีขาว และน้ำสุดท้ายมีพีเอชเป็นกลาง จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสมาอัดรีดน้ำ แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหาผลผลิตของเซลลูโลส แสดงในหน่วยกรัมเซลลูโลสต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร (g/L) รวมทั้งวัดพีเอชของน้ำหมัก และความหนาของแผ่นเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย โดยให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดมาใช้ในการศึกษาต่อไป

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในสูตรอาหารที่คัดเลือกไว้

4.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอน

โดยใช้แหล่งคาร์บอนดังนี้ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแมนนิทอล และกลีเซอรอล โดยนำสูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากข้างต้น เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆความเข้มข้นร้อยละ 5 เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 เติมกรดอะซิติกร้อยละ 1 และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0นำไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้ ความหนาของแผ่นเซลลูโลส พีเอชของน้ำหมัก และผลผลิตเซลลูโลส คัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

4.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจน

โดยใช้แหล่งไนโตรเจนดังนี้ แอมโมเนียมซัลเฟต ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต น้ำแช่ข้าวโพด และสารสกัดจากยีสต์ โดยนำสูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากข้างต้น มาเติมแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการคัดเลือกจากข้างต้น ร้อยละ 5 เติมแหล่งไนโตรเจนต่างๆร้อยละ 0.1 เติมกรดอะซิติกร้อยละ 1 และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0 นำไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้ ความหนาของแผ่นเซลลูโลส พีเอชของน้ำหมัก และผลผลิตเซลลูโลส คัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

4.3 ศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 โดยนำสูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากข้างต้น มาเติมแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้างต้น ร้อยละ 5 เติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ร้อยละ 0.1 และเติมกรดอะซิติกหรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในปริมาณต่างๆ เพื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 จากนั้นนำไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารลงในอาหาร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้ ความหนาของแผ่นเซลลูโลส พีเอชของน้ำหมัก และผลผลิตเซลลูโลส คัดเลือกพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

4.4 ศึกษาการเติมเอทานอล

โดยแปรผันความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 0 0.5 1 1.5 และ 2 ของปริมาตรอาหาร โดยนำนำสูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากข้างต้น มาเติมแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ร้อยละ 5 เติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ร้อยละ 0.1 และปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จากนั้นนำไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นทำการเติมเอทานอลในความเข้มข้นต่างๆ และเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารลงในอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้ ความหนาของแผ่นเซลลูโลส พีเอชของน้ำหมัก และผลผลิตเซลลูโลส

5. การวิเคราะห์

5.1 ผลผลิตเซลลูโลส

อบกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน และนำเซลลูโลสที่ได้มาวางบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำมาอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ จากนั้นนำเซลลูโลสมาชั่งหาน้ำหนัก และนำมาคำนวณหาน้ำหนักเซลลูโลสแห้งจากสูตร

<u>การคำนวณ</u>

น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง (กรัมต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ)

= น้ำหนักกระดาษกรองที่มีเซลลูโลสหลังอบ – น้ำหนักกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

จากนั้นนำน้ำหนักเซลลูโลสแห้งมาคำนวณผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากสูตร

$$\text{ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง} \times 1000 \text{ มิลลิลิตร}}{\text{ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)}}$$

5.2 ความหนาของแผ่นเซลลูโลส

แผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการหมัก มาวัดความหนาโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ในหน่วยมิลลิเมตร โดย 1 แผ่นเซลลูโลสวัด 5 จุด นำมาหาค่าเฉลี่ย

5.3 พีเอชของน้ำหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้ pH meter

4.6 ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในอาหารที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสม

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย นำสภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้มาใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ แบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาส์กนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นทำการเติมเอทานอลในความเข้มข้นที่เหมาะสม และเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้ ความหนาของแผ่นเซลลูโลส พีเอชของน้ำหมัก และผลผลิตเซลลูโลส เปรียบเทียบกับอาหารสูตรที่คัดเลือกได้ก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

4.7 การผลิตกระดาษจากเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสม

เตรียมอาหารโดยใช้สูตรอาหารที่ได้คัดเลือก และใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมักที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูง ซึ่งได้จากการศึกษาในข้างต้น นำไปต้มให้เดือด เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตักแบ่งใส่ถาดหมัก ปิดด้วยผ้าขาวบาง ทิ้งให้เย็น เติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1ร้อยละ 10 โดยปริมาตรของอาหาร ทำการหมักเป็นเวลา 10 วัน เก็บแผ่นเซลลูโลสที่ได้ล้างน้ำให้สะอาด แช่ในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ร้อยละ 0.5 เป็นเวลา 1 คืน นำมาล้างน้ำ ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อกำจัดแอมโมเนียมออก นำมาอัดรีดน้ำ อบที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จะได้แผ่นแห้ง นำแผ่นแห้งมาต้มด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อฟอกสีแผ่นเซลลูโลสให้ขาว นำมาล้างน้ำ อัดรีดน้ำและนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จะได้กระดาษจากเซลลูโลสที่ได้จากการหมักน้ำเปลือกแตงโม และผลิตกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรที่คัดเลือกได้จากข้างต้น ก่อนที่จะนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบผลกับกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสม

4.8 ศึกษาสมบัติเชิงกลของกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1

นำกระดาษเซลลูโลสที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติเชิงกล เช่น ความแข็งแรงดึง (tensile strength) ค่ายืด ณ จุดขาด (Elongation at break) และค่ามอดูลัสของยังส์ (Young's Modulus) โดยใช้เครื่องมือ Universal Testing Machine ในการวิเคราะห์ เปรียบเทียบกับกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรที่คัดเลือกได้จากข้างต้น ก่อนที่จะนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

4.9 ศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส

นำกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการศึกษาข้างต้นมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อดูการจัดเรียงตัวของเส้นใย เปรียบเทียบกับกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรที่คัดเลือกได้จากข้างต้น ก่อนที่จะนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

4.10 การวิเคราะห์สถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ($P \leq 0.05$)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำเปลือกแตงโมซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมาใช้ผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย จะทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเปลืองแตงโม เพื่อให้ได้ปริมาณเซลลูโลสสูง นำเซลลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษ ลดการตัดต้นไม้ เพื่อเอาเนื้อไม้มาทำกระดาษ เป็นการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมอีกด้านหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส

เซลลูโลสจากแบคทีเรียถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1886 โดย A.J. Brown เขาสังเกตเห็นว่าเซลล์ในระยะพักของเชื้อ *Acetobacter* สามารถผลิตเซลลูโลสได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน และน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเซลลูโลสที่ผลิตจากแบคทีเรียเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ที่ขับออกมานอกเซลล์ โดยเซลลูโลสที่พบในกลุ่มของจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และสาหร่าย ซึ่งในสาหร่ายสีเขียวมีโครงสร้างของผนังเซลล์เป็นพอลิแซคคาไรด์ เซลลูโลสพบได้น้อยในสาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta) ส่วนใหญ่จะพบในสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) และสาหร่ายสีทอง (Chrysophyta) นอกจากนี้ยังพบในเชื้อราบางชนิดสร้างอยู่ในชั้นของผนังเซลล์มักอยู่ในรูปของ β-1 ⟶ 3 หรือ β-1⟶ 6 linked D-glucan (Isizawa และ Araragi, 1976) แบคทีเรียแกรมลบที่ผลิตเซลลูโลส เช่น *Acetobacter Agrobacterium Achromobacter Aerobacter Sarcina Azotobacter Rhizobium Pseudomonas Salmonella* และ *Alcaligenes* การสังเคราะห์เซลลูโลสโดยแบคทีเรียแกรมบวก *Sarcina ventriculi* มีประมาณร้อยละ 15 ของมวลเซลล์แห้งทั้งหมด (Bellamy., 1974) ซึ่งแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเซลลูโลส คือ *A. xylinum* (Brown., 1987) *A. hansenii* (Jung และคณะ, 2005) และ *A. pasteurianus* (Yoshino และคณะ, 1996)

2.1.1 ลักษณะของเชื้อ *Acetobacter*

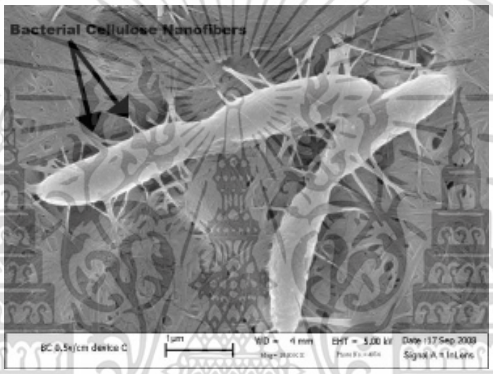
แบคทีเรียในกลุ่ม Alphaproteobacteria อยู่ในแฟมิลี Acetobacteraceae ประกอบด้วย 6 จีนัส คือ *Acetobacter Acidomona Asaia Gluconacetobacter Gluconobacter* และ *Kozakia*เชื้อในจีนัสนี้ไม่สามารถสลายแลคโตส และแป้งได้ อยู่ในกลุ่มของ Chemoorganotroph แบคทีเรียในจีนัส *Acetobacter* แยกได้จากน้ำส้มสายชู เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ ไซเดอร์ และเตกิลา นอกจากนี้เชื้อดังกล่าวยังสามารถแยกได้จากผลไม้ เช่น องุ่น ฝรั่ง ซาโปดิลลา มะเฟือง มังคุด มะม่วง กล้วย มะละกอ ดอกไม้ และจากแหล่งอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าว เมล็ดปาล์ม และเต้าหู้ (Kersters และคณะ, 2006)

ลักษณะทั่วไปของ *Acetobacter* มีรูปร่างตั้งแต่รูปไข่ จนกระทั่งรูปร่างแท่งตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย ติดสีแกรมลบ เซลล์มีขนาดกว้าง x ยาว ประมาณ 0.6-0.8 x 1.0-1.4 ไมโครเมตร มักอยู่แบบเดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่ รูปร่างที่ซับซ้อนมีเกิดขึ้นในบางสายพันธุ์ และอาจเป็นรูปทรงกลมยาว พองตัว รูปกระบอง โค้ง หรือเป็นเส้นก็ได้ เซลล์มีทั้งเคลื่อนที่ได้ และไม่ได้ หากเซลล์เคลื่อนที่ได้จะมีแฟลกเจลลาเป็นแบบ Peritrichous หรือมีแฟลกเจลลาที่ด้านข้าง ไม่พบการสร้างเอนโดสปอร์ เป็น Obligate aerobe เมแทบอลิซึมเป็นแบบใช้ออกซิเจน โคโลนีมีสีขาว ซึ่งสายพันธุ์ส่วนใหญ่จะไม่สร้างรงควัตถุ (Pigments) บางสายพันธุ์สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้หรือมีโคโลนีเป็นสีชมพูจากสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Porphyrins ที่สร้างขึ้น แบคทีเรียให้ผลบวกกับ Catalase test แต่ให้ผลลบกับ Oxidase test ไม่สามารถย่อยเจลาติน และไม่สร้าง H_2S สามารถออกซิไดซ์เอทานอลให้กลายเป็นกรดอะซิติกได้ ซึ่งกรดอะซิติกจะถูกออกซิไดซ์ต่อให้กลายเป็น CO_2 และ H_2O สามารถใช้เอทานอล กลูโคส และกลีเซอรอลเป็นแหล่งของคาร์บอนเพื่อการเจริญได้

Acetobacter xylinum สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และพีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 5.4-6.3 ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (Aerobic) สามารถสร้างเซลลูโลสออกมานอกเซลล์ได้ แสดงดังรูปที่ 2.1 เจริญได้ดีในอาหารที่มีเอทานอล และกลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอนได้ สามารถสร้าง 5-Ketogluconic acid จากกลูโคสมี Doubling Time ในสภาวะการเลี้ยงแบบสภาวะนิ่ง (Static culture) อยู่ที่ระหว่าง 8-10 ชั่วโมง และในสภาวะเขย่า (Agitated system) ที่ 4-6 ชั่วโมง (Bungay และคณะ, 1997)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของเชื้อ *Acetobacter xylinum*
ที่มา : http://www.azonano.com/news.aspx?newsID=8590 (2 กรกฎาคม 2556)

2.2 เมแทบอลิซึมของคาร์บอนใน *Acetobacter xylinum*

Acetobacter xylinum มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลายชนิด กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตของ *A. xylinum* มีด้วยกัน 2 วัฏจักร คือ วัฏจักรเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate) สำหรับการออกซิเดชันคาร์โบไฮเดรต และวัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle) สำหรับการออกซิเดชันกรดอินทรีย์ และสารที่เกี่ยวข้องใน *A. xylinum* จะไม่พบฟอสโฟฟรุคโตไคเนสหรือพบได้น้อย ส่งผลให้ปฏิกิริยาไกลโคไลติกไม่เกิดขึ้นหรือเกิดขึ้นได้น้อยแสดงให้เห็นว่า *A. xylinum* ไม่สามารถใช้กลูโคสได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Vandamme และคณะ, 1997) วิถีเมแทบอลิซึมของ *A. xylinum* แสดงดังรูปที่ 2.2

อัตราการผลิตเซลลูโลสใน *Acetobacter xylinum* แปรผกผันกับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ จากรูปที่ 2.2 แสดงให้เห็นว่า *A. xylinum* ไม่สามารถที่จะเผาผลาญกลูโคสได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ เนื่องจากว่าขาดเอนไซม์ phosphofructose kinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับกระบวนการไกลโคไลซิส กระบวนการกลูโคนีโอเจเนซิสเกิดขึ้นใน *A. xylinum* จาก oxaloacetate

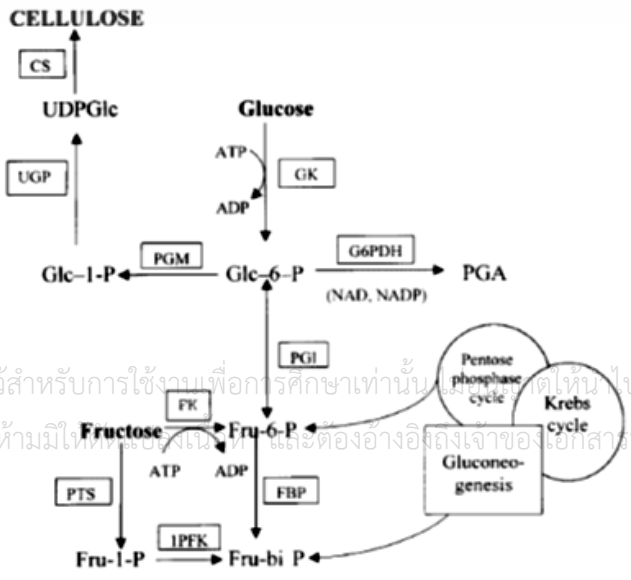
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผ่านไพรูเวท เพราะว่าการควบคุมที่ผิดปกติของเอนไซม์ oxaloacetate decarboxylase และ pyruvate phosphate dikinase ดังนั้นเซลลูโลสที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตเกิดจากเมแทบอลิซึมของ hexose phosphate โดยตรงจากกระบวนการ phosphorylation ของ exogenous hexoses และโดยอ้อมจากวัฏจักรเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate) และวัฏจักรกลูโคนีโอเจนิก (Gluconeogenic) การเปลี่ยน hexose phosphate เป็นเซลลูโลสโดยตรงไม่จำเป็นต้องรวมโครงสร้างของคาร์บอนที่เกิดจากการแตกตัวของโมเลกุลของ hexose การไหลเวียนของคาร์บอน hexose phosphate ไปเป็นเซลลูโลสหรือผ่านวัฏจักรเพนโตสฟอสเฟต เป็นการควบคุมโดยกลไกการควบคุมพลังงานโดยเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenases ใน *A. xylinum* จะถูกควบคุมโดย ATP (Bacic และ Delmer, 1981)

2.3 กระบวนการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum*

Uridinediphosphoglucose (UDPG) เป็นสารตัวกลางที่นำมาใช้ในการสร้างสาย 1,4-β-glucan โดยมี glucose-1-phosphate เป็นสารเริ่มต้นผ่านกระบวนการที่อาศัยเอนไซม์ UDP-glucose pyrophosphorylase ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถทำงานได้โดยไม่ได้รับผลกระทบจากความเข้มข้นของกลูโคสหรือฟรุกโตสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่สามารถสร้างเซลลูโลส เอนไซม์ UDP-glucose pyrophosphorylase จะสามารถทำงานได้ดีกว่าในเซลล์ที่ไม่มีการสร้างเซลลูโลส 100 เท่า

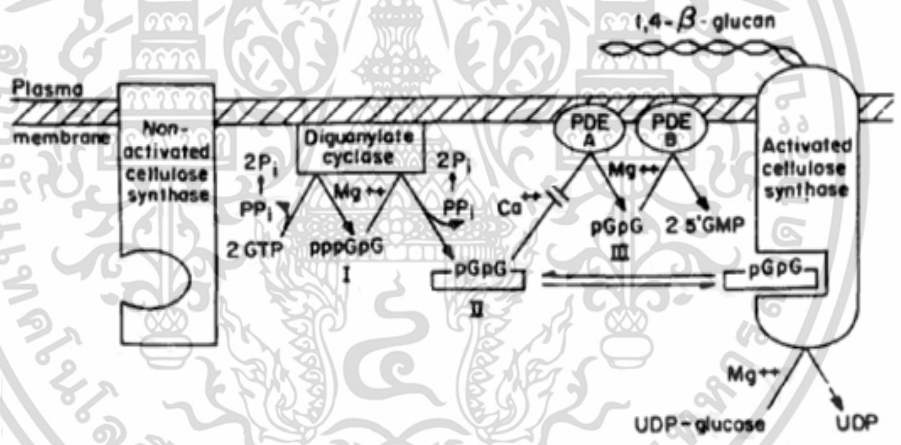
กระบวนการสร้างสาย 1,4-β-glucan เกิดขึ้นโดยการทำงานของเอนไซม์ 1,4-β-D-glucosyltransferase ซึ่งเกาะติดอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยมี c-di-GMP ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการสังเคราะห์ (Key regulatory element) ซึ่งเป็น Allosteric activator ของเอนไซม์ 1,4-β-D-glucosyltransferase โดย c-di-GMP จะจับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่ง regulatory site ซึ่งเป็นตำแหน่งจับคนละตำแหน่งกับตำแหน่งสังเคราะห์ (Catalytic site) หรือตำแหน่งที่ใช้ในการจับกับสับเสตรท (Substrate-binding site) การจับระหว่าง c-di-GMP และเอนไซม์ 1,4-β-D-glucosyltransferase จะจับกันในทิศทางผันกลับ ซึ่งหากไม่มี c-di-GMP เข้ามาช่วยจับกับเอนไซม์ การทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวจะไม่เกิดขึ้น c-di-GMP สังเคราะห์โดยเอนไซม์ Diguanylatecyclase โดยใช้Guanosinetriphosphate เป็นสับเตรทและใช้ GTP 2 โมเลกุล ผ่านตัวกลาง pppGpG การควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลสแสดงดังรูปที่ 2.3



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.2 วิถีของกระบวนการเมทาบอลิซึมของ *A. xylinum* จากแหล่งคาร์บอน CS คือ cellulose synthase, FBP คือ fructose-1, 6-biphosphate phosphatase, FK คือ glucokinase, G6PDH คือ glucose -6-phosphatedehydrogenase, 1PFK คือ fructose-1-phosphatekinase, PGI คือ phosphoglucoisomerase, PMG คือ phosphoglucomutase, PTS คือ system of phosphotransferases, UGP คือ pyrophosphorylase UDPGlc, Fru-bi-P คือ fructose -1,6-biphosphate, Fru-6-P คือ fructose-6-ph osphate, Glc-6(1)-P คือ glucose-6(1)-phosphate, PGA คือ phosphogluconic acid, UDPGlc คือ uridine diphosphoglucose

ที่มา : Bielecki และคณะ (2002)



รูปที่ 2.3 แสดงแบบจำลองการควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลสของ *A. xylinum*

ที่มา : http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2554/biol20454sp_ch2.pdf (2 กรกฎาคม 2556)

กระบวนการสังเคราะห์สายเซลลูโลสจะหยุดโดยกิจกรรมของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ Phosphodiesterase A และ B (PDE A, PDE B) โดย PDE A จะเปลี่ยน c-di-GMPb เป็น pGpG โดย pGpG จะสลายตัวเพื่อสร้างเป็น 5'-GMP 2 โมเลกุล อย่างรวดเร็ว PDE A สามารถยับยั้งการทำงานได้ด้วยไอออนของ Ca^{2+} (Vandamme และคณะ, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการสร้างสาย 1,4-β-glucan เอนไซม์ Cellulose Synthase จะไปกระตุ้นการสังเคราะห์เซลลูโลสโดยการเชื่อมต่อหน่วยกลูโคสให้กลายเป็นสาย 1,4-β-glucan การสร้างเส้นใยเซลลูโลส (Precellulosic polymer) เกิดขึ้นใน Cytoplasmic membrane ในกระบวนการสร้างสาย 1,4-β-glucan ได้มี 2 ทฤษฎีที่อธิบายถึงกระบวนการดังกล่าว ในทฤษฎีแรก ได้สันนิษฐานว่าการสังเคราะห์สาย 1,4-β-glucan ไม่ได้เกี่ยวข้องกับสารตัวกลางไขมัน (Lipid intermediate) กลูโคสจะเติมเข้าไปที่ปลายสาย non-reducing ของสายพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งปลายสาย reducing จะเป็นปลายที่เพิ่งเริ่มสร้างใหม่ ตั้งอยู่ไกลออกไปจากเซลล์ มุมบิดระหว่างกลูโคสที่อยู่ติดกัน 2 โมเลกุลในโมเลกุลของเซลลูโลสมีค่า 180° และสายโซ่ที่ยาวขึ้นจะรักษาการบิดของแกนเป็นสองเท่าของ 1,4-β-glucan ส่วนในทฤษฎีที่สอง กล่าวไว้ว่าการสังเคราะห์สาย 1,4-β-glucan เกี่ยวข้องกับสารตัวกลางไขมัน (Lipid intermediate)

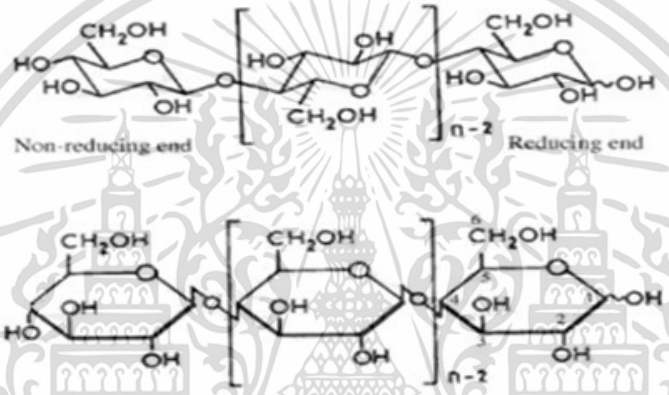
ในจลนศาสตร์การสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำมะพร้าวเป็นเวลา 3-14 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน และปริมาณของน้ำตาล พบว่าเชื้อดังกล่าวใช้ $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ดีกว่า $(NH_4)_2SO_4$ เล็กน้อย เชื้อเริ่มสร้างเซลลูโลสในวันที่ 4 ของการทดลองในด้านการใช้แหล่งของคาร์บอนพบการเปลี่ยนแปลงของกลูโคสและซูโครสที่แตกต่างกัน โดยระหว่างการทดลองปริมาณของกลูโคสไม่เปลี่ยนแปลงไปมากนัก และอยู่ในระดับสมดุลเมื่อระยะเวลาผ่านไป แต่ปริมาณของซูโครสจะลดลงเรื่อยๆจนกระทั่งเกือบถึงศูนย์เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ เป็นที่น่าสังเกตว่าน้ำตาลฟรุกโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ได้มาจากการย่อยสลายของน้ำตาลซูโครสกลับไม่พบในการทดลองนี้ในช่วงท้ายของกระบวนการ ซึ่งเมื่อทดลองเพิ่มโดยการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนี้ในอาหารที่เติมฟรุกโตสลงไปเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสายพันธุ์เดียวกันนี้ไม่สามารถสร้างเซลลูโลสจากแหล่งคาร์บอนดังกล่าวได้(Budhiono และคณะ, 1999) ในการสร้างเซลลูโลสพบว่า *A. xylinum* จะสร้างที่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความสามารถในการผลิตเซลลูโลสของเชื้อจะเป็นสัดส่วนกันกับพื้นที่ผิวของขวดเลี้ยงเชื้อ (Budhiono และคณะ, 1999 ; Phunsri และคณะ, 2003)

2.4 เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (Bacterial cellulose)

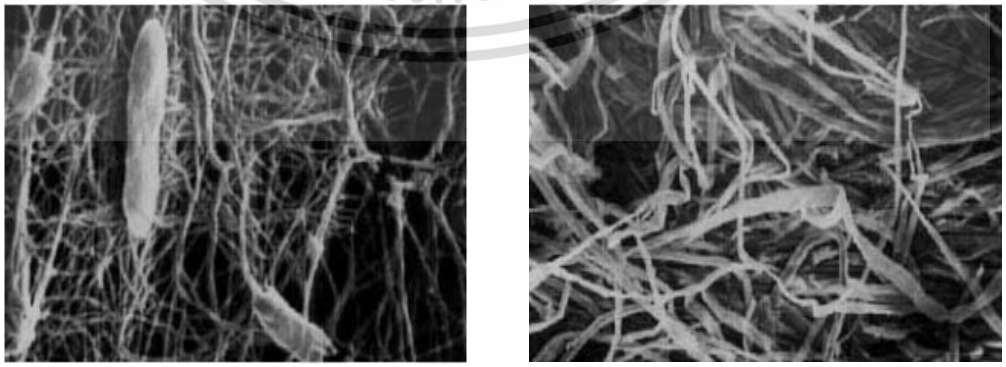
เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่มีแหล่งกำเนิดจากธรรมชาติเป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides) เชิงเส้นตรงที่ประกอบด้วยหน่วยซ้ำๆกัน มีสูตรโมเลกุลโดยทั่วไปคือ $C_6H_{12}O_6$ เซลลูโลสมีสายโมเลกุลต่อกันเป็นพันธะที่ยาวมาก และแต่ละหน่วยเรียกว่า กลูโคส สูตรโครงสร้างประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสจับกันด้วยพันธะ β (1,4) glycosidic linkage มีหมู่ไฮดรอกซิลถึง 3 หมู่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสจึงมีมาก และโครงสร้างของเซลลูโลสยังจัดตัวอย่างเป็นระเบียบ จึงทำให้เซลลูโลสมีความเป็นผลึกสูงมาก นอกจากนี้ยังพบว่าความต้านทานแรงดึงขาด ค่าความยืดหยุ่น และอุณหภูมิการหลอมตัวสูงมาก มักจะเกิดการสลายตัวก่อนถึงอุณหภูมิหลอมตัว และมีความสามารถในการละลายต่ำ เซลลูโลสหาได้ง่ายจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธรรมชาติ มีปริมาณมาก สามารถเกิดขึ้นได้ใหม่เรื่อยๆ และมีราคาถูกกว่าเส้นใยสังเคราะห์ ด้วยเหตุนี้จึงนิยมใช้เป็นสารเติมแต่งในพลาสติก โดยอาจเป็นทั้งสารตัวเติม และสารเสริมแรงเพื่อเป็นการลดต้นทุน เพิ่มปริมาณการผลิต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด และขนาดของเส้นใยที่นำมาใช้เซลลูโลสที่สร้างจากแบคทีเรียจะเรียกว่า biocellulose หรือ bacterial cellulose ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ เซลลูโลสดังกล่าวมีหน้าที่ปกป้อง รักษาระดับน้ำ และออกซิเจนภายในเซลล์ (Cook และ Covin, 1980) ทั้งเซลลูโลสจากพืช และจากแบคทีเรียจะมีโครงสร้างทางเคมีที่เหมือนกัน (รูปที่ 2.4) แต่มีลักษณะภายนอกต่างกัน (รูปที่ 2.5) (Cross และ Bevan, 1900) สำหรับเซลล์พืชเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบของไมโครไฟบริล (Microfibrils) ส่วนเซลลูโลสจากแบคทีเรียจะประกอบไปด้วยเส้นใยเล็กๆมากมายเชื่อมกันเป็นร่างแหซึ่งต่างจากจากของพืช



รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส
ที่มา : fibersource (2009)

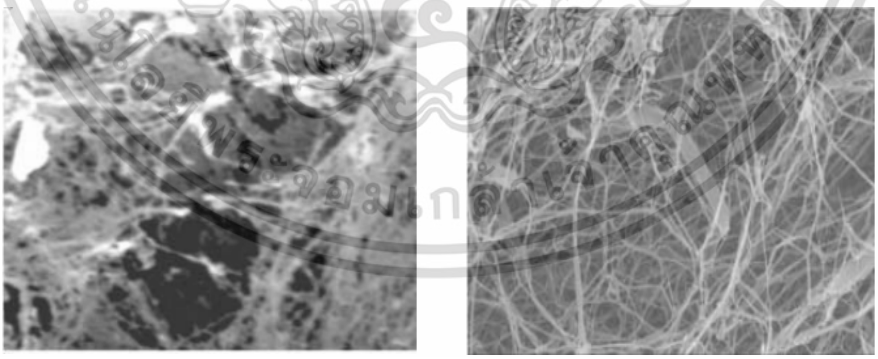


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

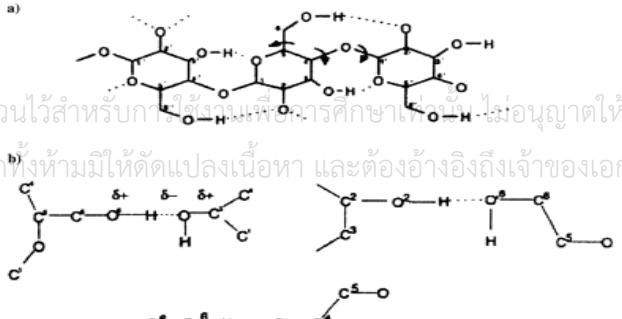
รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย (ซ้าย) เปรียบเทียบเซลลูโลสจากพืช (ขวา)
ที่มา : chemical resources laboratory (2008)

โครงสร้างเซลลูโลสจากแบคทีเรียประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า ไมโครไฟบริลขนาดกว้างประมาณ 1-25 นาโนเมตร ประกอบด้วยสายพอลิกลูแคน 10-250 สายมีความยาวประมาณ 1-9 ไมครอน มีหน่วยย่อยของกลูโคสประมาณ 2,000-18,000 หน่วย โดยไมโครไฟบริลอยู่ในลักษณะเป็นสายเรียงยาวขนานกัน แต่ละสายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนรวมอยู่เป็นมัดมีลักษณะเป็นเส้นใยเล็กๆเรียก เซลลูโลสไฟบริล มีขนาดกว้างประมาณ 100 นาโนเมตร และหนาประมาณ 3-8 นาโนเมตร มีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของพืชชั้นสูง และเส้นใยสังเคราะห์ประมาณ 10-1000 เท่า และ 100 เท่า ตามลำดับ

การสร้างเซลลูโลสจากแบคทีเรียจะเริ่มจากการรวมตัวกันของซับไฟบริลที่มีความกว้างประมาณ 1.5 นาโนเมตร และเป็นเส้นใยธรรมชาติที่บางเมื่อเทียบกับเส้นใยที่เป็นส่วนประกอบของเซลลูโลสในแคมเบียมของพืชบางชนิด (Kudlicka, 1989) เส้นใยขนาดเล็กของเซลลูโลสจากแบคทีเรียจะจับกันเป็นผลึกกลายเป็นไมโครไฟบริล (Jonas และ Farah, 1998) และเส้นใยเหล่านี้จะรวมกลุ่มพันกันเป็นเกลียวมีความหนา 3-4 นาโนเมตรกว้าง 70-80 นาโนเมตร (Zaar, 1977) หรือ 3.2 x 133 นาโนเมตร (Brown และคณะ, 1976) หรือ 4.1 x 117 นาโนเมตร (Yamanaka และคณะ, 2000) ขณะที่ความกว้างของเส้นใยเซลลูโลสที่ผลิตโดยการผลิตเยื่อกระดาษจากไม้เบิร์ชหรือสนมีขนาด 1.4-4.0 x 10^2 และ 3.0-7.5 x 10^2 นาโนเมตร ตามลำดับ การพันกันเป็นเกลียวที่ละเอียดมากของเซลลูโลสจากแบคทีเรียจะมีความยาวอยู่ในช่วง 1-9 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.6) มีโครงสร้างที่ไขว้กันเป็นร่างแหอย่างหนาแน่นโดยยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.6 แสดงภาพ SEM ของแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* ในสภาวะนิ่ง (ซ้าย) และเซลล์แบคทีเรียที่ถูกพันยึดติดด้วยเซลลูโลส (ขวา)
ที่มา : chemical resources laboratory (2008)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.7 แสดงโครงสร้างของเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่ยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน
ที่มา : http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v05/bpol5003_37_46.pdf (30 มิถุนายน 2556)

เซลลูโลสจากแบคทีเรียแตกต่างจากพืชโดยมีโครงสร้างผลึกสูง (สูงกว่าร้อยละ 60) และมีค่า Degree of polymerization (DP) ที่แตกต่างกันระหว่าง 2000-6000 (Jonas และ Farah, 1998) แต่บางกรณีมี 16,000-20,000 (Watanabe และคณะ, 1998) ขณะที่ค่าเฉลี่ย DP พอลิเมอร์ของพืชแตกต่างกันจาก 13,000-14,000 (Teeri, 1997) ลักษณะสัณฐานวิทยาที่มองเห็นด้วยตาเปล่าของเซลลูโลสจากแบคทีเรียขึ้นกับสภาวะการเพาะเลี้ยง (Watanabe และคณะ, 1998 ; Yamanaka และคณะ, 2000) ในสภาวะนิ่งแบคทีเรียจะสร้างแผ่นเซลลูโลสบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจน ซับไฟบริลของเซลลูโลสจะอัดแน่นอย่างต่อเนื่องเป็นเส้นยาวจากรูพรุนที่ผิวของเซลล์แบคทีเรียกลายเป็นผลึกของไมโครไฟบริล

นอกจากนี้เซลลูโลสจากแบคทีเรียเป็นพอลิเมอร์ที่มีความบริสุทธิ์ ปราศจากลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสมีค่าการเป็นผลึก (Crystallinity) และ Degree of polymerization สูง ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) อยู่ในช่วงระหว่าง 60-700 เท่าของน้ำหนักเซลลูโลสแห้ง มีค่า shape retention และ tear resistance ที่สูงกว่าเส้นใยสังเคราะห์หลายชนิด ค่าความแข็งแรงดึง (tensile strength) ของเซลลูโลสจากแบคทีเรียสูงกว่าฟิล์มโพลีเอทธิลีนหรือไวนิลคลอไรด์ถึง 5 เท่า ค่ามอดูลัสของยังส์ (Young's modulus) ของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย มีค่า 30 GPa สูงกว่าพอลิเมอร์อินทรีย์ทั่วไป 4 เท่า เมื่อนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียไปปั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆแล้วขึ้นรูปใหม่ ค่ามอดูลัสของยังส์ของแผ่นเซลลูโลสจากเซลลูโลสตีป่นนี้จะลดลงไป 1 ใน 3 ของค่ามอดูลัสของยังส์เดิม (Bungay และคณะ, 1997)

2.4.1 ลักษณะของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

1. เส้นใยมีขนาดเล็กมาก คือ หนาประมาณ 3-4 นาโนเมตร กว้าง 60-80 นาโนเมตร และยาวประมาณ 180-960 นาโนเมตร

2. จากการที่เส้นใยมีขนาดเล็กมาก ดังนั้นจึงทำปฏิกิริยากับสารเคมีต่างๆได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เส้นใยไม่มีเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเพคตินเจือปน

4. เส้นใยมีความเป็น Hydrophilic สูง อุ้มน้ำได้ 60-700 เท่าของน้ำหนักแห้ง

5. เส้นใยมีลักษณะใส

6. เส้นใยทนต่อแรงดึงได้สูงกว่าไฟเบอร์สังเคราะห์ต่างๆ

7. สามารถใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก หาง่าย

8. สามารถควบคุมคุณสมบัติทางกายภาพได้ ตามที่ต้องการโดยจัดองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยง และสภาวะการหมัก (ปราโมทย์, 2545)

ปัจจุบันมีความสนใจเกี่ยวกับเซลลูโลสจากแบคทีเรียมากขึ้นเนื่องจากเซลลูโลสจากแบคทีเรียถือเป็นทางเลือกใหม่ที่จะใช้ทดแทนเซลลูโลสจากพืชที่ใช้ระยะเวลาในการผลิตนานกว่าการผลิตจากแบคทีเรียที่ใช้เวลาน้อย และให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดีทดแทนการใช้พืชลดการทำลายต้นไม้ นอกจากนี้อาจเป็นการป้องกันภาวะโลกร้อนได้

เซลลูโลสจากแบคทีเรียจะมีค่าการอุ้มน้ำสูงแต่น้ำจะไม่จับตัวกับเส้นใย ทำให้สามารถรีดน้ำออกได้โดยใช้แรงกดทับ เมื่อต้องการทำให้แห้งคล้ายกับการผลิตกระดาษ โดยเมื่อแห้งแล้วจะมีความหนาประมาณ 0.01-0.05 มิลลิเมตร และมีสมบัติการดูดซับน้ำที่ดีสมบัติของเซลลูโลสจากแบคทีเรียสามารถปรับเปลี่ยนขั้นตอนการสังเคราะห์หรือวิธีการเลี้ยงให้เหมาะสมบางส่วนประกอบ เช่น อนุพันธ์ของเซลลูโลสกรดซัลฟิวริกหรือพอลิแซคคาไรด์ต่างๆ เช่น แป้ง และเด็กซ์ตรินถูกนำมาใช้เป็นอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่เป็นทางเลือกของลักษณะทางสัณฐานของแบคทีเรียค่าความแข็งแรงดึงค่าความหนาแน่นและสมบัติของการดูดซับของเซลลูโลส (Yamanaka และคณะ, 2000)

2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส

2.5.1 น้ำมะพร้าวและแหล่งคาร์บอน

น้ำมะพร้าวที่ใช้ควรเป็นมะพร้าวแก่ที่สุด และใหม่ มีไขมันน้อย ไม่มีการปนเปื้อนของน้ำมะพร้าวที่เน่าเสีย ก่อนใช้ควรนำมาต้มเพื่อให้ไขมันละลาย และฆ่าจุลินทรีย์ที่ปะปนมา ในน้ำมะพร้าวจะมีสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต (growth factor) อย่างเพียงพอ

โดยปกติกลูโคสและซูโครสจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเซลลูโลส เชื้อ *Acetobacter* sp. V6 ที่แยกได้จากการหมักน้ำส้มสายชูแบบดั้งเดิม สามารถผลิตเซลลูโลสได้ 4.16 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Son และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังมีคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ เช่น ฟรุกโตส มอลโตส ไซโลส แป้ง และกลีเซอรอล (Masaoka และคณะ, 1993)

Hestrin และคณะ (1947) เชื้อ *A. xylinum* สามารถใช้คาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ในการผลิตเซลลูโลส นอกจากกลูโคสแล้วยังสามารถใช้คาร์บอนจากแหล่งอื่นๆได้อีก เช่น ฟรุกโตส แมนนิทอล ซอร์บิทอล กลีเซอรอล กาแลคโตส แลคโตส ซูโครส และมอลโตส เซลลูโลสที่ได้มีความหนาแน่นและแข็ง นิยมซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเนื่องจากหาง่ายและราคาไม่แพง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bae และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum* BPR 2001 ในถังหมัก ซึ่งใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารพบว่า กากน้ำตาลที่ได้รับความร้อนด้วยกรดซัลฟิวริกให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงที่สุดร้อยละ 76 มากกว่ากากน้ำตาลที่ไม่ได้รับความร้อนด้วยกรดซัลฟิวริก นอกจากนี้มีอัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มขึ้น 2 เท่า โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในกากน้ำตาลที่ได้รับความร้อนด้วยกรดซัลฟิวริกจาก 23-72 กรัมต่อลิตร พบว่าการรักษาระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการผลิตเซลลูโลสในถังหมัก ซึ่งผลกระทบส่วนใหญ่มาจากส่วนประกอบในกากาน้ำตาล

Masaoka และคณะ (1993) ผลกระทบของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นในการผลิตเซลลูโลสมีความสำคัญตั้งแต่การเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิก ซึ่งเป็นผลพลอยได้ในอาหารทำให้พีเอชในอาหารลดลง และส่งผลให้การผลิตเซลลูโลสลดลงด้วย ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นร้อยละ 100 68 และ 28 มีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 6 25 และ 48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.5.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของโปรตีนที่สำคัญในเมแทบอลิซึมของเซลล์ และเป็นส่วนประกอบร้อยละ 8-14 ของมวลเซลล์แห้ง ไนโตรเจนเป็นสารที่มีความสำคัญในการสร้างเซลลูโลส อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของอาหารจะทำให้ *Acetobacter* ไม่สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ แหล่งไนโตรเจนได้แก่ สารพวกอินทรีย์ และอนินทรีย์ เช่น เกลือแอมโมเนียม แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมฟอสเฟต อยู่ในรูปของไนเตรต เช่น ยูเรีย หรืออยู่ในรูปของสารอาหารที่สกัดจากธรรมชาติ เช่น สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน หรือน้ำแช่ข้าวโพด เป็นต้น (Kouda และคณะ, 1997)

Lapuz และคณะ (1967) พบว่าการใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตร้อยละ 0.1 สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับแอมโมเนียมซัลเฟต และเปปโตน ในขณะที่การใช้โพแทสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท ไม่พบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และไม่เกิดการสร้างเซลลูโลสเนื่องจากพบว่าสารประกอบไนเตรตเป็นพิษต่อแบคทีเรียชนิดนั้น

Yang และคณะ (1998) ศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นยีสต์สกัดในการเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตเซลลูโลสในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน โดยการเติมยีสต์สกัด ลงในอาหารในช่วง 5-60 กรัมต่อลิตร และเติมแหล่งคาร์บอน 20 กรัมต่อลิตร พบว่าการเติมยีสต์สกัดความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 6.7 กรัมต่อลิตร

Matsuoka และคณะ (1996) พบว่าน้ำแช่ข้าวโพดสามารถกระตุ้นการผลิตเซลลูโลสได้ เมื่อเติมน้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 0.15 ของปริมาตร ในอาหารที่มีฟรุกโตสร้อยละ 4 ของน้ำหนักต่อปริมาตร ทั้งนี้เนื่องจากมีแลคเตทในน้ำแช่ข้าวโพด ซึ่งไม่พบในแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ

ความต้องการไนโตรเจนของแบคทีเรียจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส รวมถึงสภาวะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส เช่น แหล่งคาร์บอน พีเอช และอุณหภูมิ (Masaoka และคณะ, 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 ความเป็นกรด – ด่าง

กรดที่นิยมนำมาใช้ปรับความเป็นกรด-ด่าง คือ น้ำส้มสายชู (Acetic acid) เพราะกรดจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการเพื่อให้เชื้อ *Acetobacter xylinum* ผลิตเซลลูโลสได้ดียิ่งขึ้น โดยพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสอยู่ในช่วง 4-6 และผลผลิตเซลลูโลสจะลดลงเมื่อมีพีเอชต่ำกว่า 4.0 (Masaoka และคณะ, 1993) การที่พีเอชในระหว่างการหมักลดลงเป็นเพราะมีการสะสมของกรดกลูโคนิก กรดอะซิติกหรือกรดแลคติกในอาหาร (Kongruang และคณะ, 2008) ดังนั้นการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญ

Verschuren และคณะ (2000) ศึกษาการหมักที่สภาวะนิ่ง โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นน้ำหมัก และมีการเติมซูโครสลงไป ศึกษาที่พีเอชต่างๆกัน ได้แก่ พีเอช 3.0 4.0 5.0 และ 6.0 พบว่าที่พีเอช 4.0 และ 5.0 ให้ผลผลิตในการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* ได้มากที่สุด

Masaoka และคณะ (1993) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสโดย *A. xylinum* ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร Standard medium ที่พีเอช ระหว่าง 2.5-7.0 พบว่าที่พีเอช 4.0-6.0 เชื้อสามารถสร้างเซลลูโลสสูง โดยเฉพาะพีเอช 5.0 สามารถสร้างเซลลูโลสได้สูงที่สุด

2.5.4 อุณหภูมิ

Acetobacter xylinum สามารถเจริญ และสร้างวุ้นได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส (Cannon และ Anderson, 1991) หรือช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส (Romano และคณะ, 1989) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลลูโลสในกระบวนการพอลิเมอไรเซชั่น และความสามารถในการอุ้มน้ำ การสังเคราะห์เซลลูโลสของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่า Degree of polymerization (DP) ประมาณ 10,000 และมีความสามารถในการอุ้มน้ำร้อยละ 164 เมื่อเปรียบเทียบกับการสังเคราะห์เซลลูโลสที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่า DP ต่ำกว่า และมีความสามารถในการอุ้มน้ำสูงกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Schmauder และคณะ, 1992)

Kouda และคณะ (1997) เชื้อ *Acetobacter* ส่วนใหญ่มีการเจริญและผลิตเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 10-40 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่าหรือสูงกว่านี้มากๆ เชื้อไม่สามารถเจริญได้ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสม และเจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส

Lapuz และคณะ (1967) พบว่าการสร้างเซลลูโลสมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยการสร้างเซลลูโลสเกิดขึ้นได้เร็วเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดี และอุณหภูมิที่เชื้อเจริญเติบโตได้ดีอยู่ระหว่าง 28-32 องศาเซลเซียส

2.5.5 ออกซิเจน

Acetobacter xylinum เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ดังนั้นภาชนะในการหมักต้องผิวหน้ากว้าง เพราะเชื้อจะสร้างแผ่นวุ้นเฉพาะส่วนบนของน้ำมะพร้าวเท่านั้น และระหว่างการหมักต้องระวังไม่ให้มีการกระทบกระเทือนเพราะจะทำให้แผ่นวุ้นจม ดังนั้นในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักเพื่อให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้เร็วและสร้างเซลลูโลสได้ดีที่สภาวะนิ่ง ภาชนะที่ใช้หมักต้องมีสภาวะนิ่ง และเมื่อเชื้อมีจำนวนและความหนาแน่นในระดับหนึ่งจะเริ่มสร้างวุ้นขึ้น (Schramm และ Hestrin, 1954)

Shirai และคณะ (1994) ออกซิเจนที่ละลายน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อการผลิตเซลลูโลส การเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งสารอาหารจะต้องมีขนส่งโดยการแพร่และเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ทั่วไป โดยมีออกซิเจนเป็นปัจจัยสำหรับการเผาผลาญของเซลล์และอาจมีผลกระทบต่อการผลิตเซลลูโลส รวมทั้งคุณภาพของเซลลูโลสที่ได้

Kouda และคณะ (1997) ผลกระทบของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในการผลิตเซลลูโลสของแบคทีเรียโดยเชื้อ *Acetobacter* ในสภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ อัตราการผลิตขึ้นอยู่กับอัตราการถ่ายเทออกซิเจน เมื่อออกซิเจนในอาหารลดลงจะทำให้อาหารมีความหนืดเพิ่มขึ้นและความดันออกซิเจนที่สูงไม่ส่งผลกระทบต่อการผลิตเซลลูโลส ขณะที่อัตราการผลิตเซลลูโลสจะลดลงเมื่อมีความดันคาร์บอนไดออกไซด์สูง ซึ่งสามารถแก้ไขโดยการเพิ่มอัตราการไหลของอากาศ

Watanabe และคณะ (1995) ศึกษาผลของออกซิเจนที่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลส พบว่าที่สภาวะนิ่งการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* เพื่อผลิตเซลลูโลสขณะที่มีการเจริญเติบโตและสร้างเซลลูโลสนั้นเชื้อมีการสร้างเจลาตินเกิดขึ้นด้วย ซึ่งเจลาตินมีผลต่อการสร้างเซลลูโลสเนื่องจากไปขัดขวางการถ่ายเทออกซิเจนของเชื้อในอาหารเหลว ทำให้การถ่ายเทอากาศได้ไม่ดี จึงได้เพิ่มออกซิเจนลงไปในอาหาร จากการทดลองการให้ออกซิเจนร้อยละ 10 และร้อยละ15 พบว่า ทำให้การสร้างเซลลูโลสสูงกว่าสภาพออกซิเจนที่บรรยากาศปกติ

นอกจากการเติมอากาศลงไปในอาหารโดยตรงเพื่อเป็นการเพิ่มออกซิเจนให้กับเชื้อในระหว่างการหมักแล้ว ยังได้มีการเติม Micro-particle ลงในอาหารหมักที่สภาวะเขย่า เช่น Cellulose porous beads (CPBs) ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลสที่การหมักในสภาพกวนได้ด้วย (Krusong และคณะ, 1998)

2.5.6 เอทานอล และกรดอะซิติก

Acetobacter เป็นกลุ่มเชื้อที่สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้ ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนเกือบทุกสายพันธุ์รวมทั้ง *A. aceti* สามารถเจริญในอาหารเหลวและลอยบนผิวอาหารเหลวได้โดยมีการสร้างเส้นใยสีขาวเกิดขึ้นที่สภาวะนิ่งนอกจากนี้ *A. xylinum* สามารถสร้างเส้นใยได้ และจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียเซลลูโลสด้วย

Naritomi และคณะ (1998) ศึกษาเอทานอลที่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสโดยใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญแบบต่อเนื่อง จากการศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR 3001 A ในอาหาร 10 กรัมต่อลิตรนั้น จะมีการสร้างเซลลูโลสเพิ่มขึ้นร้อยละ 46 แต่เมื่อเปลี่ยนเอทานอลจาก 10 กรัมต่อลิตร เป็น 15 กรัมต่อลิตร หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากกว่า พบว่าอัตราการสร้างเซลลูโลสลดลง ซึ่งเอทานอลจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ และการใช้น้ำตาลในกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรีย

Toda และคณะ (1997) ศึกษาการสร้างเซลลูโลสที่สภาวะนิ่งของเชื้อ *A. xylinum* ในอาหาร Glucose medium เมื่อมีการเติมกรดอะซิติกลงไปจะไปทำให้มีการสร้างเซลลูโลสเพิ่มขึ้นจากเดิม 4 เท่า และนอกจากนี้ถ้าเติมกรดอะซิติกลงไป 20 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการสร้างเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อ *A. pasteurianus* ที่สภาวะเดียวกัน

Matsuoka และคณะ (1996) ศึกษาผลกระทบของสารตั้งต้นหลายชนิดของวัฏจักร oxidative metabolic ในการผลิตเซลลูโลสและการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยเชื้อ *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR 2001 พบว่าเอทานอลมีประสิทธิภาพในการให้พลังงานมากกว่าแลคเตท ซึ่งถ้าเติมเอทานอลลงในอาหารจะช่วยให้การผลิตเซลลูโลสดีขึ้นเช่นเดียวกับการเติมแลคเตท ในทางปฏิบัติการผลิตเซลลูโลสอย่างต่อเนื่องจะเลือกใช้เอทานอลมากกว่ากรดแลคติก เนื่องจากเอทานอลมีราคาถูกกว่ามาก

2.6 การนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาประยุกต์ใช้

2.6.1 การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์

เซลลูโลสที่ถูกเลี้ยงแบบสภาวะนิ่งจะถูกนำไปใช้เป็นวัสดุตกแต่งแผลได้อย่างเป็นธรรมชาติ และได้รับการรับรองมาตรฐานของวัสดุตกแต่งแผล เนื่องจากเป็นวัสดุที่สามารถทำให้ปลอดเชื้อได้ มีรูพรุน มีความยืดหยุ่น มีความสามารถในการดูดซับ และมีความชื้นที่เหมาะสม ซึ่งง่ายต่อการนำไปใช้งาน และการจัดเก็บรักษา การใช้แผ่นเซลลูโลสเป็นวัสดุตกแต่งแผล จะทำให้บาดแผลสมานตัวได้อย่างรวดเร็วช่วยในการป้องกันการติดเชื้อในขั้นที่ 2 นอกจากนี้ยังไม่ส่งผลกระทบต่อกลไกการเกิดใหม่ของเนื้อเยื่อในกรณีของบาดแผลที่เกิดจากไฟไหม้ แผ่นเซลลูโลสยังช่วยป้องกันการเจ็บปวดจากการดูดซับความร้อนของบาดแผลได้อีกด้วย

Krystynowicz และคณะ (2000) ได้ทำการเตรียมเซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum* และรายงานว่าเซลลูโลสที่ผลิตขึ้นสามารถนำมาใช้ในการตกแต่งบาดแผลได้ บริษัท Xylos ได้นำเซลลูโลสมาใช้ในการตกแต่งบาดแผลภายใต้เครื่องหมายการค้า Prima Cel ™ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 ผู้ป่วยร้อยละ 54 ที่ได้รับการตกแต่งบาดแผล มีแผลสมานกันเป็นอย่างดี บริษัท Biofil และ Bioprocess ได้นำเซลลูโลสที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อ *A. xylinum* มาประยุกต์ใช้ทางการค้าโดยใช้เป็นผิวหนังเทียม เพื่อใช้ในการบำบัดแผลไฟไหม้ขั้นที่ 3 แผลเปื่อย และเซลล์เนื้อเยื่อที่ตายการศึกษาของบริษัท Gengiflex พบว่าเซลลูโลสสามารถนำมาใช้เป็นเนื้อเยื่อปกคลุมได้ (Jonas และ Farah, 1998)

เนื่องจากสมบัติของเซลลูโลสแบคทีเรียที่มีค่าทนต่อแรงดึงขาดสูง, มีความยืดหยุ่น และมีสมบัติให้ของเหลวและก๊าซซึมผ่านได้เซลลูโลสแบคทีเรียชนิดแห้งถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นเยื่อป้องกันถูกตรึง Oxidation ของกลูโคสใน Biosensor ในการตรวจสอบระดับกลูโคสในเลือด

2.6.2 การประยุกต์ทางอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มีการนำเซลลูโลสแบคทีเรียมาทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารในระดับการค้าได้แก่วุ้นมะพร้าว (nata de coco) (Sutherland, 1998) ซึ่งเป็นอาหารว่างพื้นบ้านของชาวฟิลิปินส์ โดยผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมะพร้าว และน้ำตาลซูโครส ทำให้ได้แผ่นวุ้นเซลลูโลส โดยผู้บริโภคเชื่อกันว่าการกินวุ้นมะพร้าวจะช่วยต้านการเกิดมะเร็งในลำไส้ โรคเครียด โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และป้องกันการเพิ่มปริมาณน้ำตาลในปัสสาวะ ดังนั้นวุ้นมะพร้าวจึงได้รับความนิยมในการบริโภคเพิ่มขึ้น

จีนได้ผลิตอาหารที่มีเซลลูโลสจากแบคทีเรียเป็นส่วนประกอบขึ้นเรียกว่า ชาเห็ด (teakvass หรือ tea-fungus) โดยได้จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ และแบคทีเรีย กรดอะซิติกในชาที่มีส่วนประกอบของน้ำตาล ซึ่งจะเกิดเซลลูโลสบนผิวหน้า และเอนไซม์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยกิจกรรมของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย และชาจะจำเพาะเจาะจงไปกระตุ้นส่วนของลำไส้เพื่อป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ (Lguchi และคณะ, 2000)

นอกจากนี้มีการศึกษาการนำแผ่นเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. xylinum* มาประยุกต์ใช้เพื่อผลิตไวน์ และน้ำผลไม้โดยใช้เป็นตัวกรอง และตัวตรึงสาร polyphenols ได้เป็นผลสำเร็จ (Krystynowicz และคณะ, 1999) ได้มีการผลิต anthocyanins เป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพในอาหารควบคุมน้ำหนักจำพวกเส้นใย โดยนำมาใช้ในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้เซลลูโลสจากแบคทีเรียยังสามารถนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของเบเกอรี่ที่มีบทบาทในเรื่องของเส้นใย รสชาติ กลิ่นรวมไปถึงยืดอายุในการเก็บรักษาได้เป็นอย่างดี

2.6.3 การผลิตกระดาษ

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการผลิตเยื่อกระดาษประเภทอื่นๆ เพื่อลดปริมาณการใช้การตัด การทำลายทรัพยากรป่าไม้ใหญ่ๆลงได้ โดยใช้เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (Bacterial Cellulose) ซึ่งสามารถสร้างสารประกอบเซลลูโลสเป็นสายยาวประมาณครั้งละ 12-70 โมเลกุล สายเซลลูโลสนี้ออกมาจากช่องเปิด (Pores) ที่เรียงกันอยู่เป็นแถวๆบนผนังเซลล์แบคทีเรีย มีระยะห่างช่องเปิดประมาณ 10 นาโนเมตร สายเซลลูโลสที่พ่นออกมาจะลงไปอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื่อมต่อกับสารเซลลูโลสอันอื่นๆด้วยพันธะไฮโดรเจน (H-Bond) เมื่อเกิดขบวนการทางชีวภาพที่บริเวณผิวเซลล์แล้วจะได้เส้นใยขนาดเล็กคือ ไฟบริล (Fibril) ไฟบริลนี้มีคุณภาพเหนือกว่าไฟบริลของพืช มีขนาด 0.01 ไมครอน เล็กกว่าเส้นใยของไม้ และพืชชนิดอื่นถึง 30 เท่า มีคุณสมบัติอุ้มน้ำไว้ได้มากกว่าพืชอื่นๆ และมีลักษณะประสานกันคล้ายร่างแห ได้มีการนำไปทดลองสร้างเป็นแผ่นกระดาษที่คาดว่าจะมีคุณสมบัติกันเสียงสะท้อน (Acoustic Diaphram) เพื่อใช้กับอุตสาหกรรมผลิตอุปกรณ์เครื่องเสียง เป็นต้น

วุ้นมะพร้าวเป็นแหล่งเซลลูโลสชั้นดีสามารถนำมาทำกระดาษคุณภาพพิเศษ เช่น กระดาษพาร์ชเมนท์ ที่มีคุณสมบัติป้องกันน้ำมันหรือไขมันรั่วซึมได้เป็นเวลานาน ทั้งยังมีค่าต้านทานแรงดึงสูงเมื่อเปียกน้ำ ทึบแต่โปร่งแสง รวมทั้งสามารถป้องกันอากาศผ่านเข้าออกได้อีกด้วย

นักวิจัยได้เริ่มศึกษามาตั้งแต่ปี 2540 จนได้กรรมวิธีในการผลิตกระดาษพาร์ชเมนท์จากวุ้นมะพร้าว เส้นใยที่ได้มีลักษณะเป็นแผ่นคล้ายกระดาษ โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* สามารถนำไปใช้ในงานหัตถกรรม เช่น โคมไฟ โคมเทียนหอม กระดาษทำการ์ดอวยพร นามบัตร และวัสดุตกแต่งอื่นๆ ต่อมาได้พัฒนาเครื่องมือรวมไปถึงเครื่องอัดรีดน้ำขนาดแรงอัด 10 ตันสำหรับการบีบน้ำออกจากแผ่นเซลลูโลสเพื่อใช้เป็นบรรจุภัณฑ์

อย่างไรก็ดี ตลาดบรรจุภัณฑ์มีการแข่งขันที่สูงมาก ในขณะที่บรรจุภัณฑ์กระดาษวุ้นมะพร้าวนั้น มีต้นทุนที่สูงไม่สามารถเข้าไปแย่งส่วนแบ่งในตลาดบรรจุภัณฑ์ที่มีอยู่ก่อนแล้ว จึงต้องหันไปในส่วนของหัตถกรรมโดยการพัฒนาต่อยอดไปเรื่อยๆ

Johnson และ Neogi (1989) รายงานว่าโครงสร้างที่เป็นร่างแหของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าเหมาะสมที่จะนำมาผลิตกระดาษที่มีคุณภาพสูง และพวกเขายังพัฒนาส่วนประกอบของเส้นใยแก้ว แคลเซียมคาร์บอเนต และผงทองแดง

Yamanaka และ Watanabe (1994) แสดงให้เห็นว่าการสลายเซลลูโลสจากแบคทีเรียให้กลายเป็นเยื่อกระดาษสามารถนำไปผลิตกระดาษที่มีความแข็งแรงดึงสูง ซึ่งเส้นใยของเซลลูโลสจากแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความแข็งแรงให้กับเยื่อกระดาษ และทนทานต่อการพับ ซึ่งกระดาษที่ประกอบด้วยเซลลูโลสจากแบคทีเรียร้อยละ 15 ทำให้มีความทนทานต่อการพับเพิ่มเป็น 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อกระดาษบริสุทธิ์ และค่ามอดูลัสของยังส์เพิ่มขึ้นจาก 2.0-3.5 กิโลพาสคาล

Cheng และคณะ (2011) ศึกษาความแข็งแรงทางกลของกระดาษ CMC-BC ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าแผ่นกระดาษ CMC-BC มีความแข็งแรงดึง และค่ามอดูลัสของยังส์ที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกระดาษธรรมดา

2.6.4 การประยุกต์ใช้ทางด้านอื่นๆ

เซลลูโลสจากแบคทีเรียมีลักษณะทางกายภาพและทางกลที่เป็นเอกลักษณ์ เช่น ความยืดหยุ่นสูง น้ำหนักเบา พกพาสะดวก มีความบริสุทธิ์ มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง ดูดความชื้น มีความยืดหยุ่นสูง และย่อยสลายได้ทางธรรมชาติ ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตวัสดุที่ต้องการสมบัติดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นในทางอุตสาหกรรมที่มีราคาแพง เช่น ลำโพงคุณภาพดี หูฟัง กระดาษกรอง กระดาษธนบัตร เป็นต้น (Wan และคณะ, 2009)นอกจากนี้ยังมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการกู้คืนแร่และน้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 แตงโม (Watermelon)

รูปที่ 2.8 แตงโมพันธุ์กินรี

ที่มา : http://alangcity.blogspot.com/2012/08/blog-post_4381.html (9 ตุลาคม 2556)

ชื่อทางวิทยาศาสตร์ : *Citrullus lanatus*

ชื่อสามัญ : Watermelon

วงศ์ : Cucurbitaceae

ชื่ออื่นๆ : บักโม บะเต้า แตงจีน อุลิตปูลิต เป็นต้น

ถิ่นกำเนิด : เริ่มมีการปลูกแตงโมในแถบเมดิเตอร์เรเนี่ยนอย่างน้อย 3,000 ปีมาแล้ว จากนั้นจึงแพร่กระจายไปยังจีนราว 1,100 ปีที่ผ่านมา ไปยังเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ราว 300 ปีต่อมา และจากจีนไปยังญี่ปุ่นเมื่อราว 500 ปีที่แล้ว ส่วนการแพร่กระจายไปยังทวีปอเมริกานั้นเกิดขึ้นภายหลังจากที่ชาวยุโรปเริ่มเดินทางสำรวจแผ่นดินใหม่ทั่วโลก ปัจจุบันแตงโมร้อยละ 50 ผลิตจากเอเชีย ประเทศผู้ผลิตสำคัญได้แก่ ตุรกี อิหร่าน จีน สหรัฐ อินเดีย ไทย และบราซิล ในประเทศไทยมีการปลูกแตงโมทั่วทุกภูมิภาค และปลูกได้ทุกฤดู

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : แตงโมเป็นไม้ล้มลุกประเภทเถาเลื้อย มีอายุสั้น ลักษณะต้นเป็นเถาเลื้อยไปตามดิน ลำต้นเป็นสีเขียว ใบเป็นใบเดี่ยว ออกตามข้อ โคนใบกว้าง ปลายใบแหลมเล็กๆ ขอบใบเว้าลึก แผ่นใบมีสีเขียว มีปลายสีขาวกระจายไปทั่ว ดอกสีเหลืองออกตามส่วนยอด ดอกแยกเพศ โดยมักมีดอกเพศผู้ติดกัน 6 ดอก สลับกับดอกเพศเมีย 1 ดอก กลีบเลี้ยงรูประฆัง ปลายแยกเป็น 5 แฉก กลีบดอกเชื่อมกัน เป็นรูประฆังกว้าง ดอกเพศผู้มีเกสรเพศผู้แยก 3 อัน ดอกเพศเมียมีรังไข่ รูปไข่ มีขนปกคลุม ผลแบบแตง มีลักษณะแตกต่างกันแล้วแต่พันธุ์ ตั้งแต่รูปทรงกลม ทรงคล้ายขอบขนาน ถึงรูปรีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางผล 15-40 เซนติเมตร เปลือกแข็ง สีเขียว สีเขียวเข้ม และสีเหลือง บ้างก็มีลวดลายสีขาวเป็นแถบยาวจากขั้วถึงปลายผลเนื้อ ผลแดง เมล็ดสีดำขนาดเล็กแทรกอยู่บริเวณใจกลางผล ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดปลูก

ประโยชน์ของแตงโม : แตงโมเป็นผลไม้ที่มีคุณสมบัติเย็นช่วยให้อารมณ์ดี เพราะมีโพแทสเซียม ที่จะช่วยควบคุมอัตราความดันโลหิต ยังมีสารไลโคปีนที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยบำรุงหัวใจ รวมถึงป้องกันมะเร็ง นอกจากนี้จะช่วยลดอาการไข้ คอแห้ง บรรเทาแผลในปาก เปลือกแตงโม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปต้มเดือด แล้วเติมน้ำตาลทราย ดื่มเพื่อป้องกันเจ็บคอ กินเป็นผลไม้สด ทำเป็นน้ำผลไม้ เปลือก

สารอาหารในแตงโม	**ปริมาณ**
พลังงาน	30 กิโลแคลอรี่หรือ 130 กิโลจูล
คาร์โบไฮเดรต	7.55 กรัม
น้ำตาล	6.2 กรัม

หรือผลอ่อนใช้ทำอาหาร

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณค่าทางอาหารของแตงโม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นใย	0.4 กรัม
ไขมัน	0.15 กรัม
โปรตีน	0.16 กรัม
วิตามินเอ ร้อยละ 3	28 ไมโครกรัม
วิตามินบี 1 ร้อยละ 3	0.033 มิลลิกรัม
วิตามินบี 2 ร้อยละ 1	0.021 มิลลิกรัม
วิตามินบี 3 ร้อยละ 1	0.178 มิลลิกรัม
วิตามินบี 5 ร้อยละ 4	0.221 มิลลิกรัม
วิตามินบี 6 ร้อยละ 3	0.045 มิลลิกรัม
กรดโฟลิก ร้อยละ 1	3 ไมโครกรัม
วิตามินซี ร้อยละ 14	8.1 มิลลิกรัม
ธาตุแคลเซียม ร้อยละ 1	7 มิลลิกรัม
ธาตุเหล็ก ร้อยละ 2	0.24 มิลลิกรัม
ธาตุแมกนีเซียม ร้อยละ 3	10 มิลลิกรัม
ธาตุฟอสฟอรัส ร้อยละ 2	11 มิลลิกรัม
ธาตุโพแทสเซียม ร้อยละ 2	112 มิลลิกรัม
ธาตุสังกะสี ร้อยละ 1	0.10 มิลลิกรัม

ที่มา : Quek และ คณะ (2007)

2.7.1 แตงโมพันธุ์กินรี

แตงโมพันธุ์กินรี มีลักษณะเป็นแตงผลกลม รสชาติที่เด่นเป็นเอกลักษณ์ของแตงโมคือหวานกรอบ และฉ่ำน้ำ เนื้อแตงโมมีสีแดงฉ่ำ ในเนื้อมีเมล็ดสีดำขนาดเล็กแทรกอยู่บริเวณใจกลางผล แตงโมเป็นพืชที่ไม่ชอบสภาพอากาศฝนตกชุก ต้องการดินที่มีความชุ่มชื้นพอเหมาะ น้ำไม่ขัง แตงโมปลูกมากในอำเภอแม่ทะ อำเภอเมือง อำเภอห้างฉัตร และอำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง

การปลูก : การปลูกแตงโมพันธุ์กินรีควรจะปลูกในฤดูร้อนเพราะรสชาติของแตงโมจะมีรสชาติที่หวานน่ารับประทานและมีสีแดงสด แต่มีอีกวิธีหนึ่งที่จะเพิ่มผลผลิตได้ คือการตัดแต่งแขนงหรือเถาการปลูกเพื่อให้ได้ผลผลิต และคุณภาพสูง จึงจำเป็นต้องมีการตัดแต่งแขนงเพื่อให้เกิดการสมดุลในการสร้าง และใช้อาหาร โดยให้ต้นแม่มีการเจริญเติบโตเต็มที่การปล่อยให้เถาแขนง และผลเจริญในระยะแรก จะทำให้เกิดการแย่งอาหารส่งผลให้ยอดของต้นแม่ชะลอหรือชะงักการเจริญ ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผลผลิต และคุณภาพต่ำ การบำรุงก็ให้ใส่ปุ๋ยสูตรเสมอบำรุงต้น ดอก และผลหรือใช้ปุ๋ยหมักชีวภาพควบคู่ไปด้วย และใช้ระบบน้ำแบบน้ำหยด เมื่อปลูกครบ 1 เดือนต้นแตงโมจะเลื้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เถาแตกกิ่งออกไปเป็นแขนง เมื่อต้นแตงโมอายุครบ 35-40 วัน แตงโมจะเริ่มออกดอกและติดผลเป็นลูกเล็กๆตามเถาที่เลื้อยบนดิน ระยะเก็บเกี่ยวผลผลิตแตงโมประมาณ 60 วัน

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.8.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

Trovatti และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย (BC) โดย *Gluconacetobacter sacchari* ในอาหาร HS ที่ประกอบด้วย กลูโคส ซูโครส ฟรุกโตส แมนนิทอล และกลีเซอรอล ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งกลูโคสให้ผลผลิตของ BC สูง (27 กรัมต่อลิตรในเวลา 96 ชั่วโมง) ผลผลิตที่ได้สามารถนำมาเปรียบเทียบกับเซลลูโลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และลักษณะเซลลูโลสที่ได้มีลักษณะเหมือนกับ BC ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น

Kurosumi และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียจากน้ำผลไม้ เช่น ส้ม สับปะรด แอปเปิล ลูกแพรญี่ปุ่น และองุ่นโดย *Acetobacter xylinum* NBRC 13693 ผลผลิตของเซลลูโลสจากแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมแหล่งไนโตรเจนในน้ำผลไม้ น้ำส้ม และน้ำลูกแพรญี่ปุ่นเหมาะสำหรับการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย เซลลูโลสจากแบคทีเรียที่ได้จากส่วนประกอบต่างๆของส้ม เช่น เปลือก และกากของส้มให้ผลผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย 0.65 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งถูกผลิตจากเปลือกส้ม 100 กรัม และกากของส้มให้ผลผลิตเซลลูโลส 17.2 กรัม

Castro และคณะ (2012) แยกสายพันธุ์แบคทีเรีย *Gluconacetobacter medellensis* จากการหมักน้ำส้มสายชู และนำมาผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยใช้อาหาร Hestrin–Schramm (HS) ที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือ มอลโตส กลูโคส ฟรุกโตส เซลโลไบโอส แมนนิทอลไซโลส ซูโครส และกาแลคโตส ซึ่งกลูโคสจะให้ผลผลิตได้สูงสุด และศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 3-7 พบว่าที่พีเอช 3.5 ให้ผลผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียสูงสุด 4.5 กรัมต่อลิตร และศึกษาระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกันพบว่าในวันที่ 8 ให้ผลผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียสูงสุด

Jagannath และคณะ (2008) ศึกษาผลกระทบของพีเอช ความเข้มข้นของซูโครส และแอมโมเนียมซัลเฟต ในการผลิตวุ้นมะพร้าวจากแบคทีเรียเซลลูโลส โดยเชื้อ *Acetobacter xylinum* และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น ความหนา น้ำหนักเปียก ความสามารถในการอุ้มน้ำ ความชื้น และความแข็งของวุ้นมะพร้าว โดยผลิตจากอาหารสูตรน้ำมะพร้าวที่ประกอบด้วย ความเข้มข้นของซูโครส และแอมโมเนียมซัลเฟตที่ค่าพีเอชแตกต่างกัน ผลการวิจัยพบว่าความหนาของแผ่นเซลลูโลสสูงที่สุดที่พีเอช 4.0 ที่มีความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 10 และแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.5 โดยในสภาวะนี้ทำให้ได้วุ้นมะพร้าวที่มีคุณภาพดี ผิวหน้าเรียบ และให้ลักษณะเนื้อสัมผัสที่นุ่ม

Premjet และคณะ (2007) การเติมกากน้ำตาลจากอ้อย เช่น ซูโครส ฟรุกโตส กลูโคส สารประกอบไนโตรเจน กรดที่ไม่ใช่ไนโตรเจน กรดนิวคลีอิก วิตามิน คาร์โบไฮเดรตอื่นๆ แร่ธาตุ และสารสีดำในอาหาร HS โดยศึกษาผลกระทบในการผลิตเซลลูโลสด้วยเชื้อ *Acetobacter*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

xylinum ATCC 10245 พบว่าการเติมวิตามิน กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรตอื่นๆ แร่ธาตุและสารสีดำในอาหาร HS ที่มีการผสมแหล่งคาร์บอนคือ ซูโครส และฟรุกโตส ทำให้ผลผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้น โดยสารสีดำให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงที่สุด

Bae และ Shoda (2005) ศึกษาอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลลูโลสโดยใช้การออกแบบ Box-Behnken พบว่าการผลิตเซลลูโลสที่ใช้ฟรุกโตสร้อยละ 4.99 น้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 2.85 ออกซิเจนที่ละลายน้ำร้อยละ 28.33 และวุ้นร้อยละ 0.38 ให้ผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 14.3 กรัมต่อลิตร

Sun และคณะ (2005) ศึกษาอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลลูโลสพบว่าอาหารที่เหมาะสมประกอบไปด้วยซูโครสร้อยละ 5 เปปโตนร้อยละ 1.5 กรดซิตริกร้อยละ 0.2 ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตร้อยละ 0.2 โพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.2 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.03 แอลกอฮอล์ร้อยละ 1 และปรับพีเอชเป็น 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร

Coban และ Biyik (2011) ศึกษาผลกระทบของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนโดยเชื้อ *Acetobacter lovaniensis* HBB 5 พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด รองลงมาคือ ซูโครส ฟรุกโตส และเอทานอล ส่วนการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด รองลงมาคือ เคซีนไฮโดรไลเซต และแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหาร HS โดยให้ผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 0.040 กรัมต่อลิตร

Yodsuwan และคณะ (2012) ศึกษาผลกระทบของคาร์บอน และไนโตรเจนในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย สำหรับวัสดุนาโนที่ใช้เป็นส่วนประกอบทางชีวภาพ โดยเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 975 ผลการวิจัยพบว่าแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนส่งผลกระทบต่อผลผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย และคุณสมบัติทางกายภาพของเซลลูโลส ซึ่งการใช้ฟรุกโตส และแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตของเซลลูโลสสูงที่สุด 3.5 และ 5.0 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้ซูโครส ขณะเดียวกันการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ทำให้การผลิตเซลลูโลสดียิ่งขึ้น

2.8.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตกระดาษจากเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

Slusarska (2008) ศึกษาลักษณะของเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยเชื้อ *Acetobacter xylinum* สำหรับประยุกต์ใช้ในการผลิตกระดาษ พบว่าน้ำหนักของเซลลูโลสจากแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างมากในวันที่ 7-8 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร HS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด รองมาคือแมนนิทอล และไซโลส ตามลำดับ และเมื่อนำไปส่องด้วยกล้อง AFM microscop พบว่ามีเส้นใยที่ยาว เรียบ และรวมกันเป็นร่างแห มีความกว้าง 70-200 นาโนเมตร นอกจากนี้เซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียมีความเสถียรต่อความร้อนได้ดี แต่จะเริ่มมีการเสียสภาพที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส และสามารถทนอุณหภูมิได้สูงสุด 350-370 องศาเซลเซียส ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากเดิม

Yamanaka และคณะ (1989) ศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติของกระดาษที่ได้จากเชื้อ *Acetobacter aceti* พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 50 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชของอาหารเป็น 5.0 บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน พบว่ากระดาษที่ได้มีค่ามอดูลัสของยังส์สูงกว่า 15 กิโลพาสคาล ซึ่งแสดงว่าโมเลกุลเซลลูโลสจับตัวกันแน่นมาก ทำให้กระดาษที่ได้มีความแข็งแรงใกล้เคียงสารในกลุ่มโพลิเมอร์

Keshk และคณะ (2005) ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของกระดาษที่ได้จากเชื้อ *Acetobacter xylinum* (ATCC 10245, IFO 13963, 13772 และ 13773) จากอาหาร HS และมีlignosulfonate ผสมอยู่ด้วย จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า เส้นใยมีลักษณะการรวมตัวกันอย่างหลวมๆและหยาบ มีค่ามอดูลัสของยังส์เท่ากับ 633.0 เมกกะพาสคาล ขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม lignosulfonate มีค่ามอดูลัสของยังส์เท่ากับ 450.76 เมกกะพาสคาล และแผ่นเซลลูโลสที่ผสม lignosulfonate มีค่าความหนืดสูงกว่าแผ่นเซลลูโลสที่เป็นชุดควบคุม คือ 76.98 และ 36.48 เซ็นติพอยส์ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแผ่นเซลลูโลสที่มีการผสม lignosulfonate จะมีค่า Degree of polymerization สูงกว่าแผ่นเซลลูโลสที่เป็นชุดควบคุม

Ochaikul และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกระดาษและคุณสมบัติของกระดาษที่ได้จากเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 พบว่าจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องพบว่า เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 8 วันให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดมีค่าเท่ากับ 12.12 กรัมต่อปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร จากนั้นนำเซลลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ในการฟอกสีทำให้กระดาษที่ได้มีค่ามอดูลัสของยังส์ ค่าความแข็งแรงดึง และค่ายืด ณ จุดขาดสูงกว่าการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นอื่นร้อยละ 0 0.5 และ 1.0

Ochaikul และคณะ (2009) ศึกษาผลของไคโตซานต่อการผลิตกระดาษจากเซลลูโลสจากแบคทีเรีย และสมบัติที่ได้ของกระดาษเซลลูโลสโดยเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 967 ในอาหาร 3 สูตร (สูตรน้ำมะพร้าว สูตรของ HS และสูตรของ Okiyama) สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสคือ อาหารสูตรน้ำมะพร้าว โดยเลี้ยงในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน การใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.1-1.0 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรน้ำมะพร้าวให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด กระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 967 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวมีการเติมสารละลายไคโตซานร้อยละ 0.2 มีความแข็งแรงดึงสูงสุด 112.20 เมกกะพาสคาล รวมทั้งดูดซึมน้ำได้มากขึ้น ไอน้ำซึมผ่านได้ลดลงร้อยละ 23 และก๊าซออกซิเจนซึมผ่านได้ลดลงร้อยละ 84 เมื่อเปรียบเทียบกับกระดาษเซลลูโลสที่ไม่เติมไคโตซาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Suwannapinunt และคณะ (2007) ศึกษาการเพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum* strain TISTR 976 ในอาหารน้ำมะพร้าวในการเพาะเลี้ยง 3 สภาวะ คือ สภาวะนิ่งในถาด สภาวะเขย่าในฟลาสก์ และสภาวะในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร ที่พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ได้ผลผลิตเซลลูโลส 4.73 5.32 และ 7.94 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของกระดาษจากเซลลูโลส พบว่ามีความต้านทานน้ำร้อยละ 124.2 25.7 และ 12.2 ตามลำดับ และศึกษาโครงสร้างขนาดเล็กด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (Scaning Electron Microscope, SEM) พบว่าสภาวะนิ่งในถาดและสภาวะเขย่าในฟลาสก์แสดงให้เห็นผลึกเส้นใยที่ประกอบด้วยการเรียงตัวของเส้นใยที่มีระเบียบ ในทางตรงข้ามสภาวะในถังหมักไม่เป็นระเบียบ และทดสอบความต้านทานน้ำ พบว่าการผลิตกระดาษจากเซลลูโลสในถังหมักมีคุณภาพต่ำกว่าการผลิตด้วยสภาวะนิ่งในถาด และสภาวะเขย่าในฟลาสก์

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูง แยกได้จากมะละกอในประเทศไทย (Suwanposri และคณะ, 2012)

3.1.2 วัตถุดิบ

1.เปลือกแตงโม แตงโมที่ใช้เป็นพันธุ์กินรี ลักษณะของเปลือกแข็งมีสีเขียวเข้ม และมีลวดลายสีขาวเป็นแถบยาวจากขั้วถึงปลายผล เนื้อแตงโมมีสีแดง

2.น้ำตาลทราย

3.น้ำมะพร้าวแก่

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1.อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโม

2.อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรมาตราฐาน HS

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.กรดซิตริก (Citric acid)

2.กรดอะซิติกเข้มข้น (Acetic acid)

3.กลีเซอรอล (Glycerol)

4.กลูโคส (Glucose)

5.ฟรุกโตส (Fructose)

6.แมนนิทอล (Mannitol)

7.น้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor)

8.แอมโมเนียมซัลเฟต (Amonuim sulphate)

9.ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (Di-ammonuim phosphate)

10.โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)

11.โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium hydrogen phosphate)

12.ยีสต์สกัด (Yeast extract)

13.เปปโตน (Peptone)

14.น้ำกลั่น (Deionized water)

15.เอทานอลร้อยละ 95 (Ethanol)

16.ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

17.แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide)

18.ผงวุ้น (Agar)

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina air flow) ยี่ห้อ Telstar รุ่น Bio II Advance 4

2.ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น INB 500

3.หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น ES-315

4.เครื่องชั่งน้ำหนักสี่ตำแหน่ง (Balance) ยี่ห้อ Sartorius รุ่น TE214S

5.เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Clean รุ่น PH200 & PH500

6.เครื่องมือวัดขนาด (Vernier calipers) ยี่ห้อ Mitutoyo รุ่น Absolute Digital Caliper

7.เครื่องอัดรีดแผ่นวุ้นมะพร้าว

8.โถปั่น (Blender)

9.ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10.ขวด Durhan ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

11.บีกเกอร์ ขนาด 500 มิลลิลิตร

12.ปิเปตขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร

13.ขวดแก้วเล็ก (Vial)

14.จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

15.ตะเกียงแอลกอฮอล์

16.ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)

17.ถาดพลาสติก

18.ผ้าขาวบาง

19.สดึงสำหรับขึงกระดาษ

20.กระดาษกรอง

3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

การดำเนินงานแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 จาก Cryotube ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว HS ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในขวดแก้วเล็ก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ทำการ Streak plate ลงบนอาหารแข็ง HS เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวใส่ในอาหารเหลว HS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมา Streak ให้เต็มจานอาหารแข็ง HS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

เตรียมอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ซึ่งประกอบด้วย น้ำมะพร้าวแก่ น้ำตาลซูโครส ร้อยละ 5 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1.0 ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 จำนวน 1 เพลทต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จะได้หัวเชื้อวุ้นมะพร้าว

3.2.2 การเตรียมน้ำเปลือกแตงโม

นำเปลือกแตงโมมาล้างน้ำให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และปั่นโดยใช้โถปั่นไฟฟ้า จากนั้นกรองเอาส่วนน้ำออกมาโดยใช้ผ้าขาวบาง นำส่วนน้ำเปลือกแตงโมมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.1 อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโม

นำน้ำเปลือกแตงโมมาปรับพีเอชเริ่มต้นให้เป็น 6.0 แบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที รอให้เย็นจากนั้นเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ที่ได้จากข้อ 3.2.1 ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.2.3.2 อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว

นำน้ำเปลือกแตงโมที่มีการเติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าวดังนี้ น้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 และกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1.0 ปรับพีเอชเริ่มต้นให้เป็น 6.0 ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บเกี่ยวผลผลิตเซลลูโลส

3.2.3.3 อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารมาตรฐาน HS

นำน้ำเปลือกแตงโมที่มีการเติมส่วนประกอบของอาหารสูตร HS ดังนี้ น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2 เปปโตนร้อยละ 0.5 ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.27 และกรดซิตริกร้อยละ 0.12 ปรับพีเอชเริ่มต้นให้เป็น 6.0 ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บเกี่ยวผลผลิตเซลลูโลส

3.2.3.4 การเก็บเกี่ยวและทำเซลลูโลสให้บริสุทธิ์

เมื่อครบ 7 วันนำเซลลูโลสออกจากอาหารหมักแต่ละสูตร นำมาต้มด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียออก (Bae และคณะ, 2004) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นหลายครั้ง เพื่อกำจัดเอาสารละลายด่างออกจากแผ่นเซลลูโลส จนกระทั่งแผ่นเซลลูโลสมีสีขาว และน้ำสุดท้ายมีพีเอชเป็นกลาง จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสมาอัดรีดน้ำ แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหาผลผลิตของเซลลูโลส แสดงในหน่วยกรัมเซลลูโลสต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร (g/L) รวมทั้งวัดพีเอชของน้ำหมัก และความหนาของแผ่นเซลลูโลส

คัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย โดยให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดมาใช้ในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในสูตรอาหารที่คัดเลือกไว้

3.2.4.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอน

โดยใช้แหล่งคาร์บอนดังนี้ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแมนนิทอล และกลีเซอรอล โดยนำสูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.3 มาเติมแหล่งคาร์บอนต่างๆความเข้มข้นร้อยละ 5 เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 เติมกรดอะซิติกร้อยละ 1 และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0นำไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร ลงในอาหารเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้ ความหนาของแผ่นเซลลูโลส พีเอชของน้ำหมัก และผลผลิตเซลลูโลส คัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2.4.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจน

โดยใช้แหล่งไนโตรเจนดังนี้ แอมโมเนียมซัลเฟต ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต น้ำแช่ข้าวโพด และสารสกัดจากยีสต์ โดยนำสูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.3 มาเติมแหล่งคาร์บอนที่ได้จาการคัดเลือกจากหัวข้อ 3.2.4.1 ร้อยละ 5 เติมแหล่งไนโตรเจนต่างๆร้อยละ 0.1 เติมกรดอะซิติกร้อยละ 1 และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0 นำไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารลงในอาหารเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้ ความหนาของแผ่นเซลลูโลส พีเอชของน้ำหมัก และผลผลิตเซลลูโลส คัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2.4.3 ศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยแปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 โดยนำสูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.3 มาเติมแหล่งคาร์บอนที่ได้คัดเลือกจากหัวข้อ 3.2.4.1 ร้อยละ 5 เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้คัดเลือกจากหัวข้อ 3.2.4.2 ร้อยละ 0.1 และเติมกรดอะซิติกหรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในปริมาณต่างๆ เพื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 จากนั้นนำไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ร้อยละ 10 ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตรอาหารลงในอาหารเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้ ความหนาของแผ่นเซลลูโลส พีเอชของน้ำหมัก และผลผลิตเซลลูโลส คัดเลือกพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2.4.4 ศึกษาการเติมเอทานอล

โดยแปรผันความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 0 0.5 1 1.5 และ 2 ของปริมาตรอาหาร โดยนำนำสูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.3 มาเติมแหล่งคาร์บอนที่ได้คัดเลือกจากหัวข้อ 3.2.4.1 ร้อยละ 5 เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้คัดเลือกจากหัวข้อ 3.2.4.2 ร้อยละ 0.1 และปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นไปตามผลที่ได้คัดเลือกจากหัวข้อ 3.2.4.3 จากนั้นนำไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นทำการเติมเอทานอลในความเข้มข้นต่างๆ และเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารลงในอาหารเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้ ความหนาของแผ่นเซลลูโลส พีเอชของน้ำหมัก และผลผลิตเซลลูโลส

3.2.4.5 การวิเคราะห์

3.2.4.5.1 ผลผลิตเซลลูโลส

อบกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน และนำเซลลูโลสที่ได้มาวางบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำมาอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ จากนั้นนำเซลลูโลสมาชั่งหาน้ำหนัก และนำมาคำนวณหาน้ำหนักเซลลูโลสแห้งจากสูตร

<u>การคำนวณ</u>

น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง (กรัมต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ)

= น้ำหนักกระดาษกรองที่มีเซลลูโลสหลังอบ – น้ำหนักกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

จากนั้นนำน้ำหนักเซลลูโลสแห้งมาคำนวณผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากสูตร

$$\text{ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง} \times 1000 \text{ มิลลิลิตร}}{\text{ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)}}$$

3.2.4.5.2 ความหนาของแผ่นเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการหมัก มาวัดความหนาโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ในหน่วยมิลลิเมตร โดย 1 แผ่นเซลลูโลสวัด 5 จุด นำมาหาค่าเฉลี่ย

3.2.4.5.2 พีเอชของน้ำหมัก

โดยใช้ pH meter

3.2.5 ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในอาหารที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสม

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย นำสภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้มาใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเตรียมอาหารที่ได้คัดเลือกจากหัวข้อ 3.2.3 นำมาเติมแหล่งคาร์บอนที่ได้คัดเลือกจากหัวข้อ 3.2.4.1 แหล่งไนโตรเจนที่ได้คัดเลือกจากหัวข้อ 3.2.4.2 และปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อตามสภาวะที่ได้คัดเลือกจากหัวข้อ 3.2.4.3 แบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาส์กนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็น จากนั้นทำการเติมเอทานอลในความเข้มข้นที่ได้คัดเลือกจากหัวข้อ 3.2.4.4 และเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารลงในอาหารเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้ ความหนาของแผ่นเซลลูโลส พีเอชของน้ำหมัก และผลผลิตเซลลูโลส เปรียบเทียบกับอาหารสูตรที่คัดเลือกได้ก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

3.2.6 การผลิตกระดาษจากเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสม

เตรียมอาหารโดยใช้สูตรอาหารที่ได้คัดเลือก และใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมักที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูง ซึ่งได้จากการศึกษาในข้างต้น นำไปต้มให้เดือด เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตักแบ่งใส่ถาดหมัก ปิดด้วยผ้าขาวบาง ทิ้งให้เย็น เติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตรของอาหาร ทำการหมักเป็นเวลา 10 วัน เก็บแผ่นเซลลูโลสที่ได้ล้างน้ำให้สะอาด แช่ในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ร้อยละ 0.5 เป็นเวลา 1 คืน นำมาล้างน้ำ ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อกำจัดแอมโมเนียมออก นำมาอัดรีดน้ำ อบที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จะได้แผ่นแห้ง นำแผ่นแห้งมาต้มด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อฟอกสีแผ่นเซลลูโลสให้ขาว นำมาล้างน้ำ อัดรีดน้ำและนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จะได้กระดาษจากเซลลูโลสที่ได้จากการหมักน้ำเปลือกแตงโม และผลิตกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรที่คัดเลือกได้จากหัวข้อ 3.2.3 ก่อนที่จะนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบผลกับกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสม

3.2.7 ศึกษาสมบัติเชิงกลของกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1

นำกระดาษเซลลูโลสที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติเชิงกล เช่น ความแข็งแรงดึง (tensile strength) ค่ายืด ณ จุดขาด (Elongation at break) และค่ามอดูลัสของยังส์ (Young's Modulus)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้เครื่องมือ Universal Testing Machine ในการวิเคราะห์ เปรียบเทียบกับกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรที่คัดเลือกได้จากหัวข้อ 3.2.3 ก่อนที่จะนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

3.2.8 ศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส

นำกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการศึกษาข้างต้นมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อดูการจัดเรียงตัวของเส้นใย เปรียบเทียบกับกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรที่คัดเลือกได้จากหัวข้อ 3.2.3 ก่อนที่จะนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

3.2.9 การวิเคราะห์สถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 20 ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ($p \leq 0.05$)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Komagataeibacter sp.* PAP1

จากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหาร 3 สูตรเปรียบเทียบกัน คือ อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโม อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว และอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารมาตรฐาน HS บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตเซลลูโลสโดยทำการวัดค่าพีเอชของน้ำหมัก วัดความหนาของแผ่นเซลลูโลส และหาผลผลิตของเซลลูโลส แสดงในหน่วยเซลลูโลสต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร (กรัมต่อลิตร) พบว่าการใช้อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าวให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด โดยแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีความหนา 4.32±0.51 มิลลิเมตร และมีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 3.16±0.12 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบของอาหารมาตรฐาน HS และอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโม ซึ่งให้ผลผลิตเซลลูโลส 2.77±0.45 และ 2.15±0.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.1 รูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 พีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหาร 3 สูตร ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

สูตรอาหาร	พีเอช[(1)] น้ำหมัก	ความหนา[(1)] (มิลลิเมตร)	ผลผลิตเซลลูโลส[(1)] (กรัมต่อลิตร)
น้ำเปลือกแตงโม	$3.61^{b(2)}$±0.01	$4.11^{b(2)}$±0.90	$2.15^{c(2)}$±0.04
น้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว	5.65^{a}±0.02	4.32^{b}±0.51	3.16^{a}±0.12
น้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารมาตรฐาน HS	3.37^{c}±0.01	5.57^{a}±0.08	2.77^{b}±0.45

หมายเหตุ

(1) ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

(2) ค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแถวแนวตั้ง แสดงถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าวให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าการหมักในอาหารสูตรอื่น ทั้งนี้เนื่องมาจากในน้ำเปลือกแตงโมมีสารอาหารที่เชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตเซลลูโลสไม่เพียงพอ เมื่อเติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าวซึ่งมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และกรดอะซิติกเป็นตัวปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส ทำให้ได้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าการใช้อาหารสูตรอื่น และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเปลือกแตงโม พบว่ามีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.70 น้ำตาลฟรุกโตสร้อยละ 1.19 และมีโปรตีนร้อยละ 0.12 โดยเชื้อสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนได้ แสดงดังตารางที่ 4.2

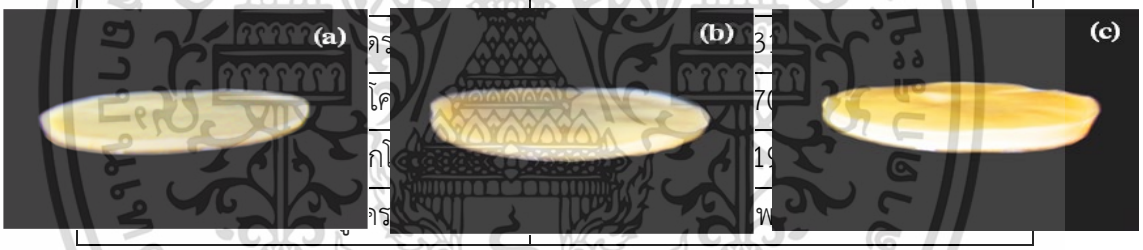
ดังนั้นจึงคัดเลือกอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว มาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ต่อไป

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเปลือกแตงโมด้วยวิธี Proximate analysis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

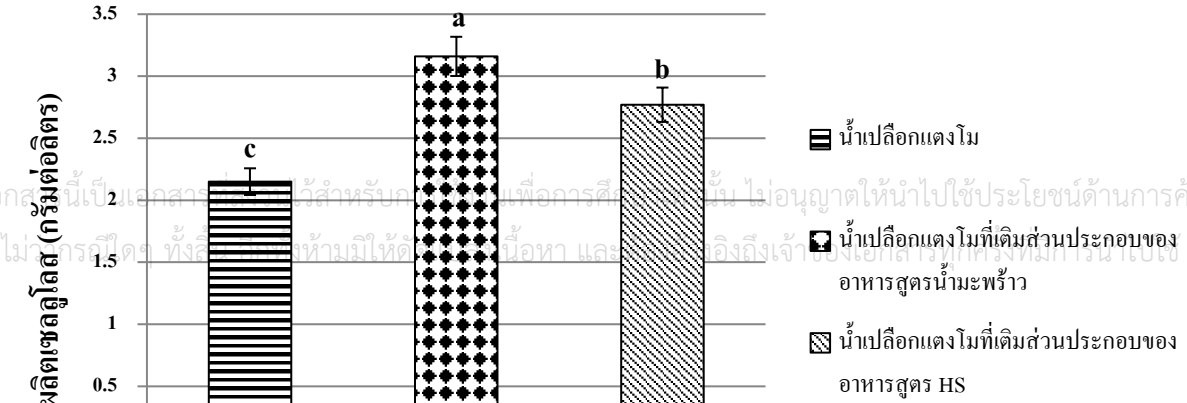
สารอาหารในน้ำเปลือกแตงโม	ปริมาณ (ร้อยละ)
พลังงานทั้งหมด	97.50 กิโลแคลอรี่
พลังงานจากไขมัน	0.00 กิโลแคลอรี่
ความชื้น	97.50
โปรตีน	0.12
ไขมัน	0.00
เถ้า	0.07
เส้นใย	0.00

ที่มา :รายงานผลการทดสอบจากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร



สูตรน้ำเปลือกแตงโม **สูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว** **สูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารมาตรฐาน HS**

รูปที่ 4.1 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหาร 3 สูตร ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น พร้อมห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหาร3 สูตร ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในสูตรอาหารที่เหมาะสม

4.2.1 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว โดยใช้แหล่งคาร์บอน 5 ชนิดเปรียบเทียบกันคือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแมนนิทอล และกลีเซอรอล เติมความเข้มข้นร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อแทนน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรเดิม บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตเซลลูโลสโดยทำการวัดค่าพีเอชของน้ำหมัก วัดความหนาของแผ่นเซลลูโลส และหาผลผลิตของเซลลูโลส แสดงในหน่วยเซลลูโลสต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร (กรัมต่อลิตร) พบว่าการใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงที่สุด โดยแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีความหนา 7.67±0.15 มิลลิเมตร และมีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 6.04±0.28 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส กลีเซอรอล และน้ำตาลฟรุกโตส ซึ่งให้ผลผลิตเซลลูโลส 4.21±0.03 3.72±0.07 2.57±0.04 และ 2.40±0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลผลผลิตเซลลูโลสจากแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนมีผลผลิตเซลลูโลสสูงที่สุด และมีความแตกต่างทางสถิติกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆที่ระดับความเชื่อมั่น 95 แสดงดังตารางที่ 4.3 รูปที่ 4.3 และรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อพีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

แหล่งคาร์บอน	พีเอช[(1)] น้ำหมัก	ความหนา [(1)] (มิลลิเมตร)	ผลผลิตเซลลูโลส [(1)] (กรัมต่อลิตร)
น้ำตาลกลูโคส	$4.01^{e(2)}$±0.02	$5.70^{b(2)}$±0.42	$4.21^{b(2)}$±0.03
น้ำตาลฟรุกโตส	5.26^{c}±0.03	3.39^{c}±0.11	2.40^{d}±0.02
น้ำตาลซูโครส	6.88^{a}±0.24	3.24^{c}±0.26	3.72^{c}±0.07
น้ำตาลแมนนิทอล	5.61^{b}±0.03	7.67^{a}±0.15	6.04^{a}±0.28
กลีเซอรอล	4.97^{d}±0.02	3.40^{c}±0.48	2.57^{d}±0.04

หมายเหตุ

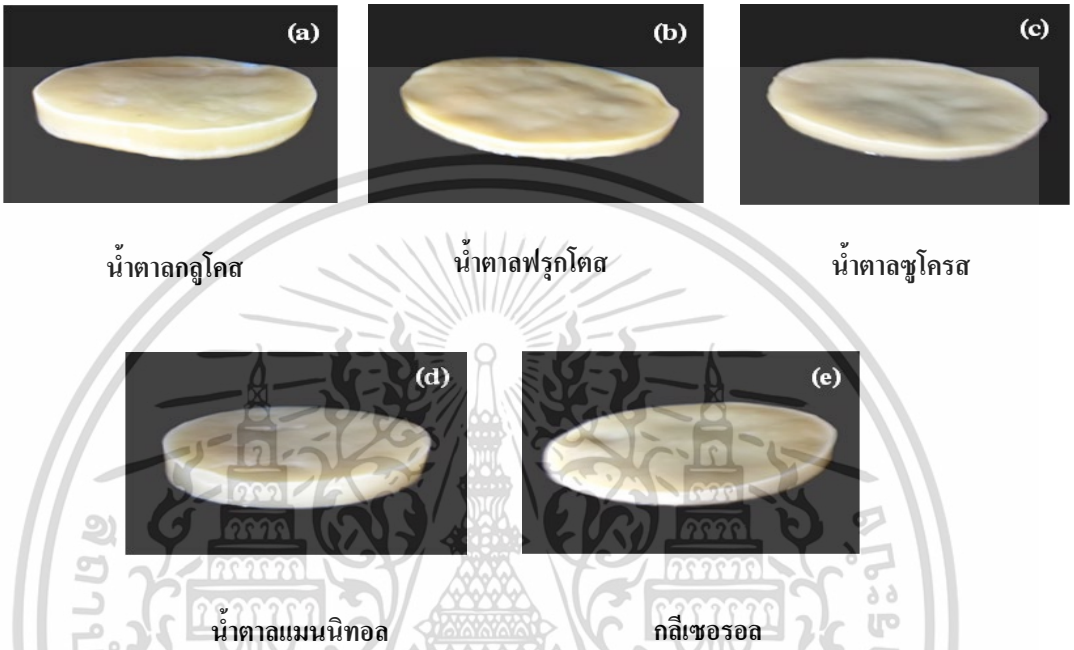
(1) ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

(2) ค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแถวแนวตั้ง แสดงถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

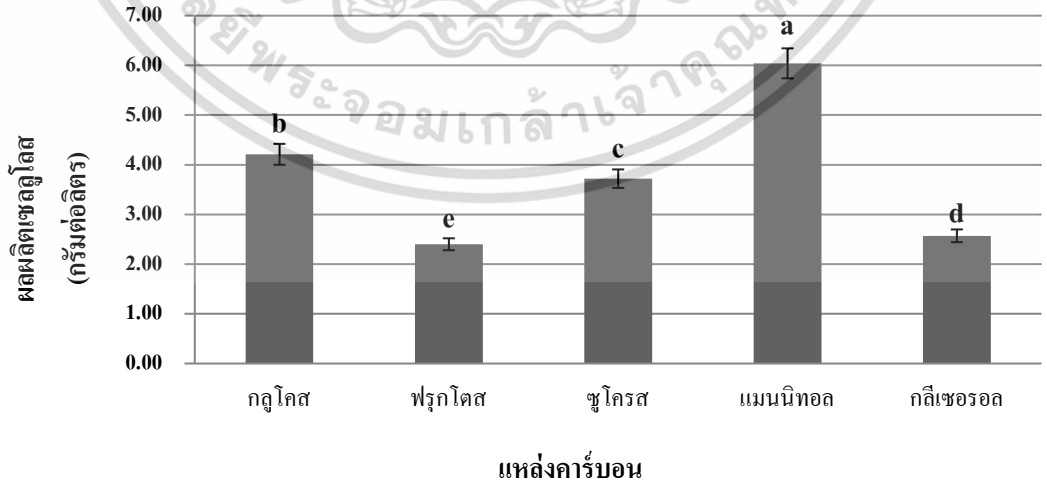
จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้เชื้อผลิตเซลลูโลสได้สูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Raghunathan (2013) ได้ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่แยกได้ใหม่จากน้ำมะพร้าวที่ถูกเทลงบนพื้นวัดซึ่งเป็นสถานที่ปฏิบัติพิธีกรรมทางศาสนาของประเทศอินเดีย เชื้อ *Acetobacter* sp. DR-1 ใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนและให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงที่สุด 1.38 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลซูโครส ตามลำดับ และสอดคล้องกับการทดลองของ Yodsuwan และคณะ (2012) ศึกษาผลกระทบของคาร์บอน และไนโตรเจนในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย สำหรับวัสดุนาโนที่ใช้เป็นส่วนประกอบทางชีวภาพ พบว่าเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 975 ใช้แมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตของเซลลูโลสสูงเป็น 5.0 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลซูโครส

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกน้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากการใช้แหล่งคาร์บอน 5 ชนิด ในการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.4 ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการใช้แหล่งคาร์บอน 5 ชนิด ในการเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Komagataeibacter sp. PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.2.2 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *G.nataicola* PAP1 ซึ่งใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว โดยใช้แหล่งไนโตรเจน 4 ชนิดดังนี้ แอมโมเนียมซัลเฟต ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต น้ำแช่ข้าวโพด และสารสกัดจากยีสต์ โดยเติมความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตเซลลูโลส พบว่าการใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด 6.57±0.09 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แอมโมเนียมซัลเฟต สารสกัดจากยีสต์และน้ำแช่ข้าวโพด ซึ่งให้ผลผลิตเซลลูโลส 6.50±0.22 6.20±0.25 และ5.71±0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และความหนาของแผ่นเซลลูโลสมีความสัมพันธ์กับผลผลิตเซลลูโลสที่ได้

เมื่อนำข้อมูลผลผลิตเซลลูโลสจากแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด และไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้น้ำแช่ข้าวโพด และสารสกัดจากยีสต์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 แสดงดังตารางที่ 4.4 รูปที่ 4.5 และรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อพีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 เซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

แหล่งไนโตรเจน	พีเอช[(1)] น้ำหมัก	ความหนา[(1)] (มิลลิเมตร)	ผลผลิตเซลลูโลส[(1)] (กรัมต่อลิตร)
แอมโมเนียมซัลเฟต	$5.32^{c(2)}$±0.02	$8.44^{b(2)}$±0.22	$6.50^{ab(2)}$±0.22
ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต	5.34^{c}±0.01	9.04^{a}±0.08	6.57^{a}±0.09
น้ำแช่ข้าวโพด	5.43^{b}±0.02	7.16^{c}±0.14	5.71^{c}±0.06
สารสกัดจากยีสต์	5.40^{a}±0.07	8.41^{b}±0.75	6.20^{b}±0.25

หมายเหตุ

(1) ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

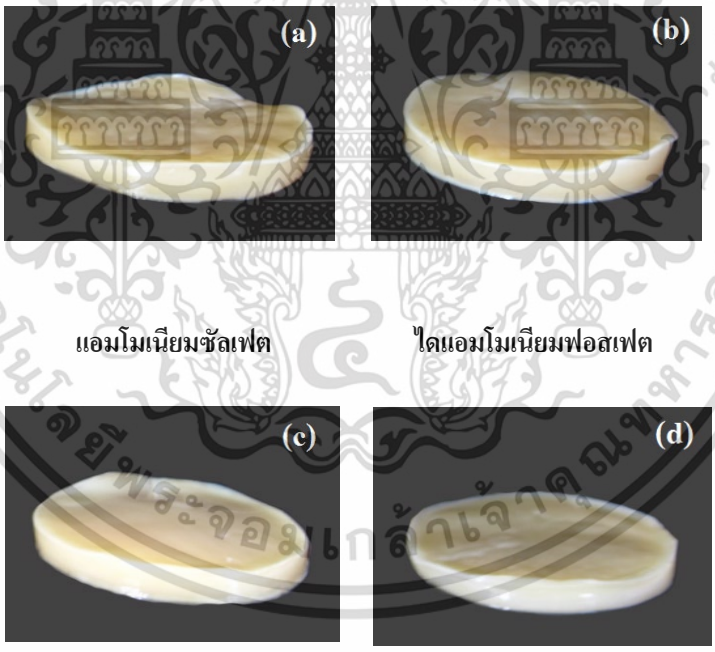
(2) ค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแถวแนวตั้ง แสดงถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้เชื้อผลิตเซลลูโลสได้สูงซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lapuz และคณะ (1967) พบว่าการใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตร้อยละ 0.1 สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงสุดเมื่อเทียบกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ขณะที่การใช้โพแทสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท ไม่พบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนี้

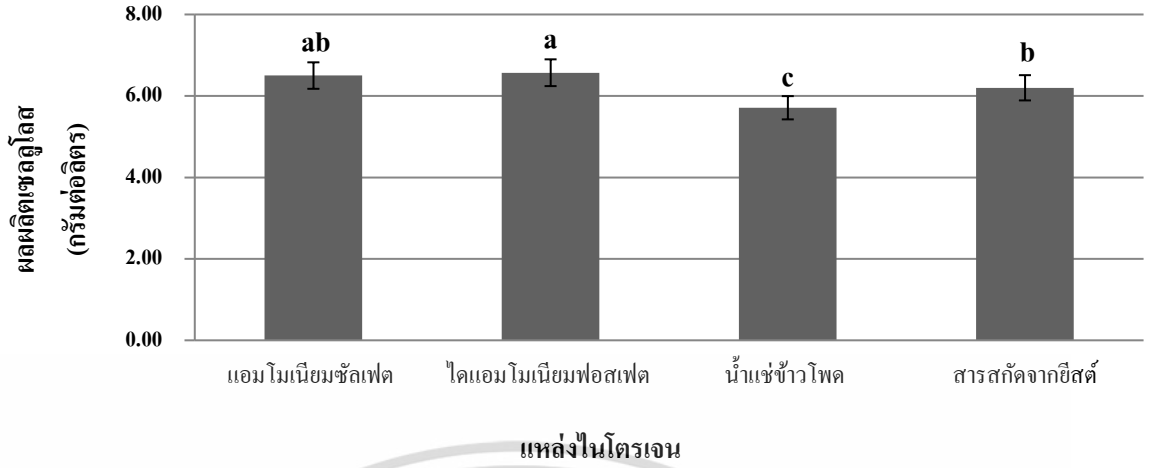
จากการใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนและให้ผลผลิตเซลลูโลสสูง อาจเนื่องมาจากไดแอมโมเนียมฟอสเฟตมีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ จึงส่งผลให้มีการเจริญของเซลล์และการผลิตเซลลูโลสสูงขึ้น Carreira และคณะ (2011) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *G. sacchari* พบว่าการผลิตเซลลูโลสจะเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเติมแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตเซลลูโลสยังขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ ถ้าวัตถุดิบที่นำใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะทำให้การผลิตเซลลูโลสจะเพิ่มขึ้น

จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไดแอมโมเนียมฟอสเฟต และแอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลผลิตเซลลูโลสไม่แตกต่างกัน แต่เนื่องจากไดแอมโมเนียมฟอสเฟตมีราคาถูกกว่า ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 4.5 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากการใช้แหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด ในการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการใช้แหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด ในการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.2.3 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว และใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตเซลลูโลส พบว่าการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0 ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด โดยมีผลผลิตเซลลูโลส 6.10±0.17 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือพีเอช 5.0 7.0 8.0 และ 4.0 ซึ่งให้ผลผลิตเซลลูโลส 5.76±0.56 5.22±0.62 4.71±0.40 และ 4.27±0.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลผลผลิตเซลลูโลสจากการศึกษาพีเอชเริ่มต้นต่างๆมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.0 ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด และไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 แต่มีความแตกต่างกับการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 8.0 และ 4.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 แสดงดังตารางที่ 4.5 รูปที่ 4.7 และรูปที่ 4.8

การปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมักเป็น 5.0 และ 6.0 ทำให้เชื้อผลิตเซลลูโลสได้สูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Hwang และคณะ (1999) ศึกษาผลกระทบของพีเอชในการผลิตเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเชื้อ *Acetobacter xylinum* BRC5 พบว่าการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.0 ทำให้มีอัตราการผลิตของกรดกลูโคนิกสูงกว่าพีเอช 5.0 และ 6.0 ในขณะที่การปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 5.0 มีการเจริญเติบโตของเซลล์และผลผลิตเซลลูโลสสูงที่สุด

ตารางที่ 4.5 ผลของการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมักที่มีต่อพีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

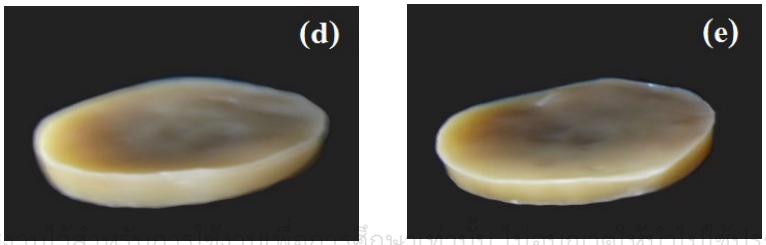
พีเอชเริ่มต้นของ อาหารหมัก	พีเอช[(1)] น้ำหมัก	ความหนา[(1)] (มิลลิเมตร)	ผลผลิตเซลลูโลส[(1)] (กรัมต่อลิตร)
พีเอช 4.0	$3.72^{d(2)}$±0.01	$7.62^{bc(2)}$±0.30	$4.27^{d(2)}$±0.09
พีเอช 5.0	4.99^{c}±0.02	8.90^{a}±0.43	5.76^{ab}±0.56
พีเอช 6.0	5.56^{b}±0.02	8.05^{b}±0.25	6.10^{a}±0.17
พีเอช 7.0	5.63^{a}±0.06	7.31^{c}±0.42	5.22^{bc}±0.62
พีเอช 8.0	5.61^{ab}±0.01	6.50^{d}±0.21	4.71^{cd}±0.40

หมายเหตุ

(1) ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

(2) ค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแถวแนวตั้ง แสดงถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

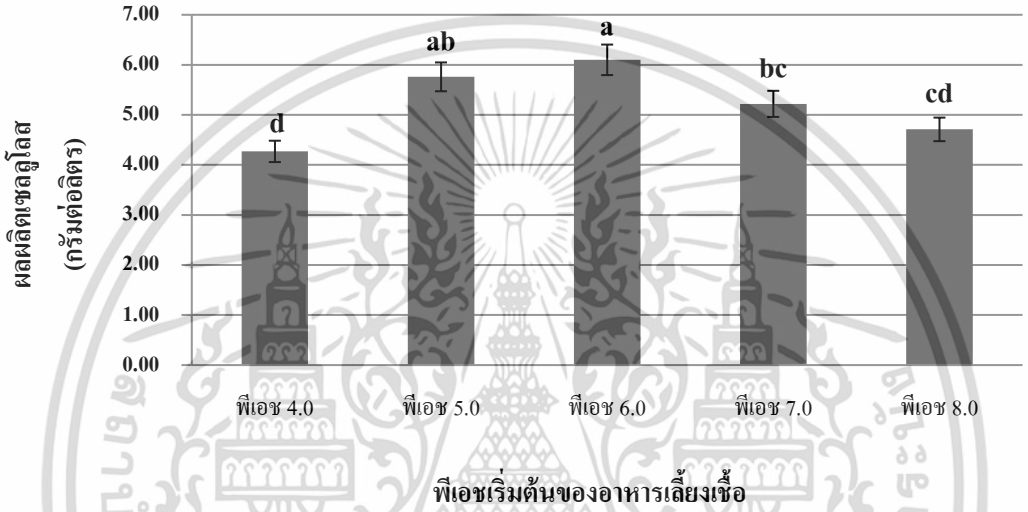
พีเอช 4.0 **พีเอช 5.0** **พีเอช 6.0**



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีเอช 7.0 **พีเอช 8.0**

รูปที่ 4.7 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากการปรับพีเอชเริ่มต้นต่างๆ ของอาหาร ในการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.8 ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการปรับพีเอชเริ่มต้นต่างๆของอาหารในการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.2.4 ผลการศึกษาการเติมเอทานอล

จากการศึกษาการเติมเอทานอลความเข้มข้นที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ซึ่งใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเป็น 5.0 และเติมความเข้มข้นของเอทานอลดังนี้ร้อยละ 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 ของปริมาตรอาหาร บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตเซลลูโลส พบว่าการเติมเอทานอลร้อยละ 0 ของปริมาตรอาหารหรือการไม่เติมเอทานอลให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด โดยมีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 6.38±0.24 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ การเติมเอทานอลร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 ของปริมาตรอาหาร โดยให้ผลผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลลูโลส 4.40±0.18 3.37±0.17 2.77±0.03 และ 1.98±0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์กับความหนาของแผ่นเซลลูโลส

เมื่อนำข้อมูลผลผลิตเซลลูโลสจากการศึกษาการเติมเอทานอลความเข้มข้นต่างๆมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 0 ของปริมาตรอาหาร หรือการไม่เติมเอทานอล ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด และมีความแตกต่างทางสถิติกับการเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 ของปริมาตรอาหาร ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 แสดงดังตารางที่ 4.6 รูปที่ 4.9 และรูปที่ 4.10

ตารางที่ 4.6 ผลของการใช้เอทานอลความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อพีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ความเข้มข้นของเอทานอล (ร้อยละ)	พีเอช[(1)] น้ำหมัก	ความหนา[(1)] (มิลลิเมตร)	ผลผลิตเซลลูโลส[(1)] (กรัมต่อลิตร)
0	$5.38^{a(2)}$±0.01	$8.36^{a(2)}$±0.40	$6.38^{a(2)}$±0.24
0.5	4.73^{b}±0.02	7.42^{ab}±0.06	4.40^{b}±0.18
1.0	4.46^{c}±0.02	5.93^{c}±1.43	3.37^{c}±0.17
1.5	4.30^{d}±0.02	6.27^{bc}±0.73	2.77^{d}±0.03
2.0	4.18^{e}±0.01	4.86^{c}±0.36	1.98^{e}±0.06

หมายเหตุ

(1) ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

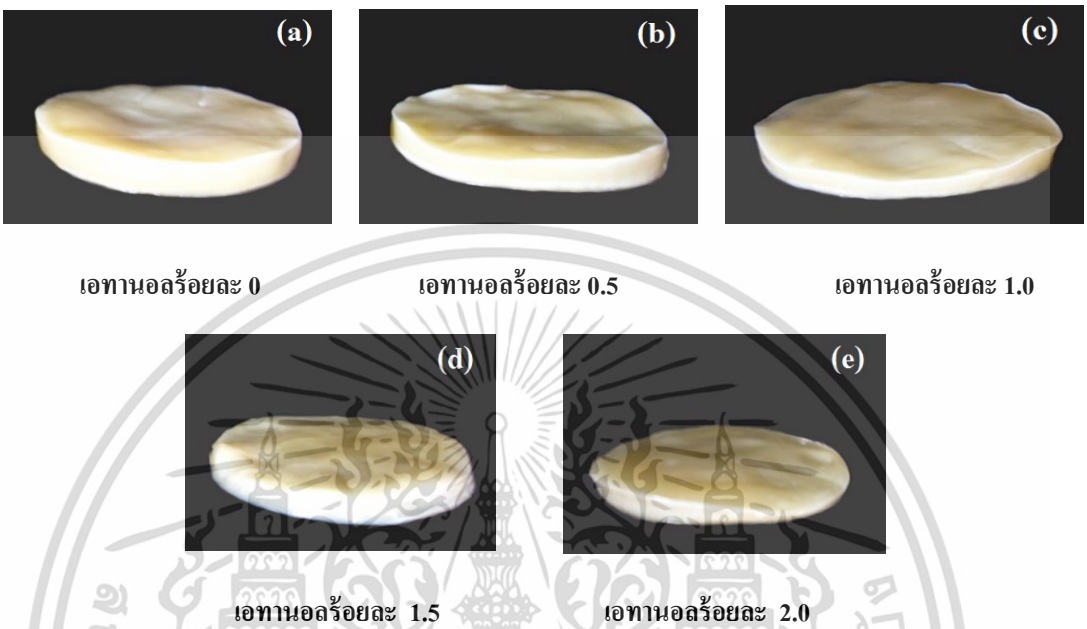
(2) ค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแถวแนวตั้ง แสดงถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเติมเอทานอลร้อยละ 0 ของปริมาตรอาหารหรือการไม่เติมเอทานอลทำให้ได้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด เมื่อใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเป็น 5.0

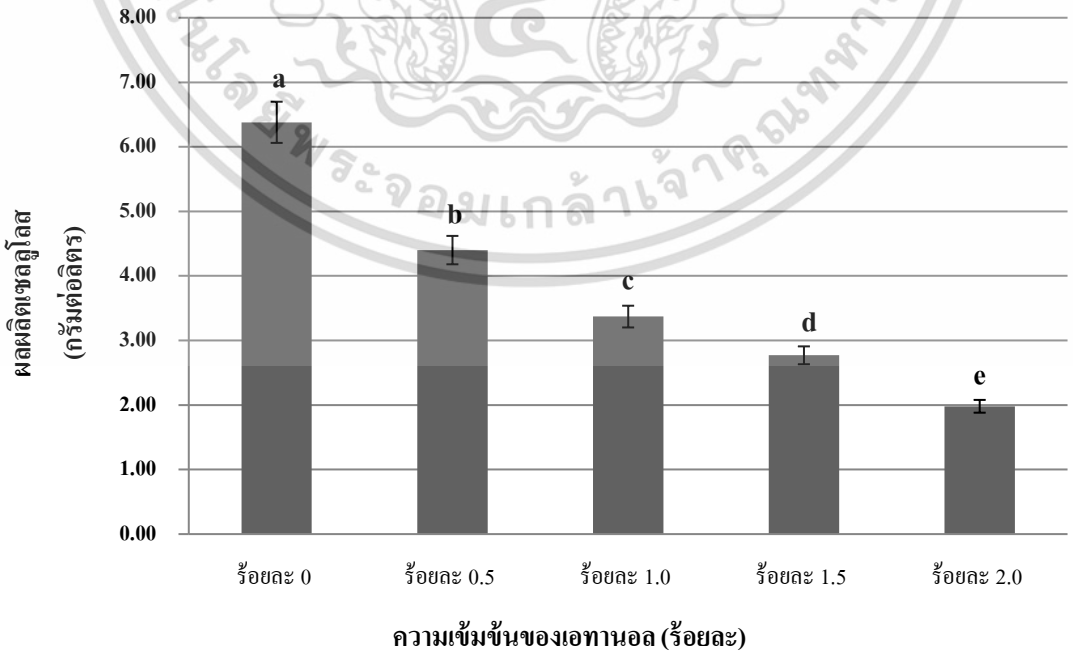
จากการเติมเอทานอลร้อยละ 0 ของปริมาตรอาหาร หรือการไม่เติมเอทานอล และให้ผลผลิตเซลลูโลสสูง เนื่องมาจากในการทดลองนี้มีการแปรผันการเติมเอทานอลร้อยละ 0.5–2.0 ของปริมาตรอาหาร อาจจะเป็นความเข้มข้นที่มากไปสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว โดยใช้น้ำตาลแมนนิทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเป็น 5.0 การเติมเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มากเกินไปจะส่งผลให้มีปริมาณอะซิเตรทในอาหารเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณเซลล์ในระยะ Stationary phate ลดลง ส่งผลให้การผลิตเซลลูโลสลดลงด้วย (Naritomi และคณะ, 1998)



รูปที่ 4.9 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากการเติมเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ ในการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.10 ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการเติมเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ ในการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.3 เปรียบเทียบการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในอาหารที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสมกับอาหารคัดเลือกก่อนศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในหัวข้อที่ 4.2 โดยคัดเลือกอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว โดยใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเป็น 5.0 และไม่มีการเติมเอทานอล ในการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตเซลลูโลส พบว่าแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 5.30±0.25 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับ อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าวก่อนศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเป็น 6.0 และไม่มีการเติมเอทานอล ให้ผลผลิตเซลลูโลส 3.20±0.24 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าการหมักเซลลูโลสโดยใช้เชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหารสูตรที่ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าสูตรอาหารคัดเลือกก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม 1.7 เท่า

เมื่อนำข้อมูลผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากสูตรอาหารคัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสมมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าอาหารสูตรคัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเป็น 5.0 และไม่มีการเติมเอทานอล ให้ผลผลิตเซลลูโลสที่สูงกว่าสูตรอาหารคัดเลือกก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.7 รูปที่ 4.11 และรูปที่ 4.12

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอาหารสูตรที่คัดเลือกคือ สูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารน้ำมะพร้าว และศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเป็น 5.0 และไม่มีการเติมเอทานอลมีความเหมาะสมสำหรับการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 เมื่อบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เนื่องจากให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่า

ตารางที่ 4.7 แสดงพีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ที่ได้จากการหมักในสูตรอาหารที่คัดเลือกและสูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสม ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	พีเอช[(1)] น้ำหมัก	ความหนา[(1)] (มิลลิเมตร)	ผลผลิตเซลลูโลส[(1)] (กรัมต่อลิตร)
สูตรอาหารที่คัดเลือก (ชุดควบคุม)	$5.82^{a(2)}\pm0.04$	$5.96^{b(2)}\pm0.64$	$3.20^{b(2)}\pm0.24$
สูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสม	$4.87^{b}\pm0.045$	$8.83^{a}\pm0.06$	$5.30^{a}\pm0.25$

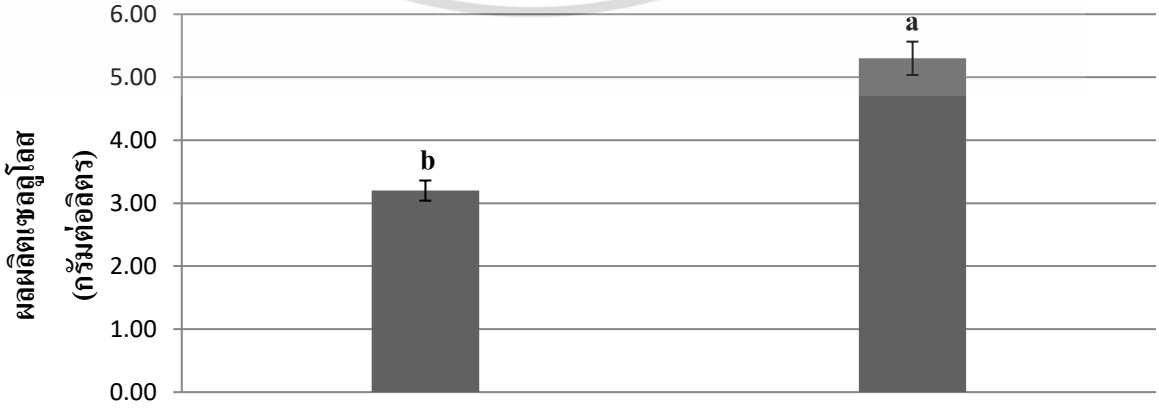
หมายเหตุ

(1) ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

(2) ค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแถวแนวตั้ง แสดงถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สูตรอาหารที่คัดเลือก **สูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสม**

รูปที่ 4.11 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในสูตรอาหารที่คัดเลือกและสูตรอาหารที่คัดเลือกและหมักในสภาวะที่เหมาะสมภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหารที่คัดเลือก สูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสม

รูปที่ 4.12 ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในสูตรอาหารที่คัดเลือกก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และสูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสม ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.4 การผลิตกระดาษจากเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสม

จากการศึกษาการผลิตกระดาษโดยเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้างต้น คืออาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ซึ่งใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเป็น 5.0 และไม่มีการเติมเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อหมักในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสมาผลิตกระดาษตามวิธีของ Ochaikul และคณะ (2004) จากการทดลองพบว่า เซลลูโลสที่ได้จากการหมักมีค่าพีเอชของน้ำหมัก 4.95±0.03 ความหนา 12.94±0.83 มิลลิเมตร และมีผลผลิตเซลลูโลส 6.44±0.18 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารคัดเลือกก่อนศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (ชุดควบคุม) พบว่า เซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสมมีผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าชุดควบคุม

เมื่อนำข้อมูลผลผลิตเซลลูโลสวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสมให้ผลผลิตเซลลูโลสที่สูงกว่าชุดควบคุม และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 แสดงดังตารางที่ 4.8 รูปที่ 4.13 และรูปที่ 4.14

ตารางที่ 4.8 แสดงพีเอชของน้ำหมัก ความหนา และผลผลิตของเซลลูโลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในสูตรอาหารที่คัดเลือกและสูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสม ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

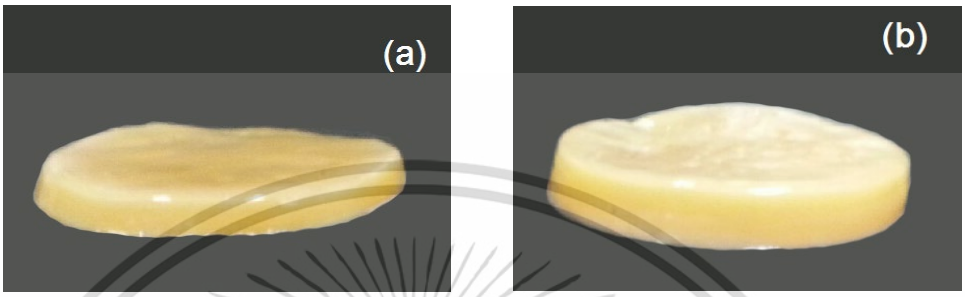
สูตรอาหาร	พีเอช[(1)] น้ำหมัก	ความหนา[(1)] (มิลลิเมตร)	ผลผลิตเซลลูโลส[(1)] (กรัมต่อลิตร)
สูตรอาหารที่คัดเลือก (ชุดควบคุม)	$6.0^{a(2)}$±0.09	$7.14^{b(2)}$±1.05	$4.53^{b(2)}$±0.29
สูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสม	4.95^{b}±0.03	12.94^{a}±0.83	6.44^{a}±0.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ

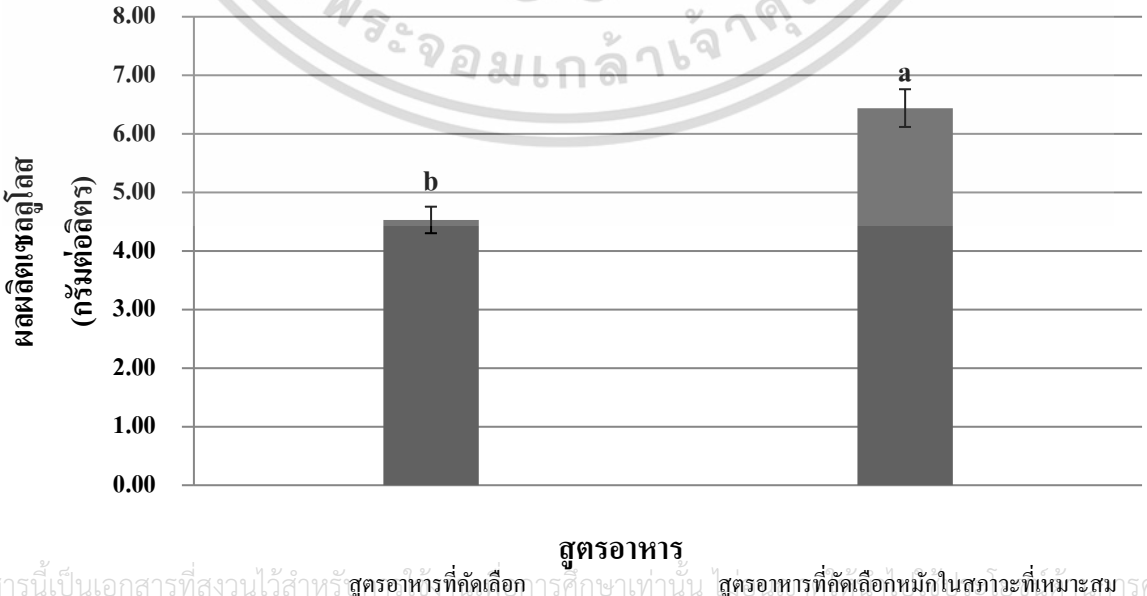
(1) ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

(2) ค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแถวแนวตั้ง แสดงถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



สูตรอาหารที่คัดเลือก **สูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสม**

รูปที่ 4.13 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหารสูตรอาหารที่คัดเลือกและสูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสมภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.14 แสดงผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหารที่คัดเลือก และอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสมภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

4.5 ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส

นำกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ชุดควบคุม) และกระดาษจากสูตรอาหารที่คัดเลือกและหมักในสภาวะที่เหมาะสมมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อดูการจัดเรียงตัวของเส้นใย พบว่ากระดาษทั้งสองชนิดมีเส้นใยขนาดเล็กจำนวนมากเชื่อมกันเป็นร่างแหอย่างหนาแน่น และลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสไม่แตกต่างกันแสดงดังรูปที่ 4.15

4.6 ผลการศึกษาสมบัติเชิงกลของกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1

นำกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าวในสภาวะที่เหมาะสมข้างต้นมาทดสอบคุณสมบัติเชิงกล โดยใช้เครื่องมือ Universal Testing Machine ในการวิเคราะห์ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสูตรอาหารที่คัดเลือกก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (ชุดควบคุม) พบว่ากระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าวและหมักในสภาวะที่เหมาะสม มีค่าความแข็งแรงดึง 98.79 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร และค่ายืด ณ จุดขาดร้อยละ 7.87 และมีค่ามอดูลัสของยังส์ 812.60 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร แสดงดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ค่าความแข็งแรงดึง ค่ามอดูลัสของยังส์ และค่ายืด ณ จุดขาดของกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสมและอาหารที่คัดเลือกก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

ชนิดของกระดาษ	ค่าความแข็งแรงดึง[(1)] (นิวตันต่อตาราง	ค่าการยืด ณ จุดขาด[(1)]	ค่ามอดูลัสของยังส์[(1)] (นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร

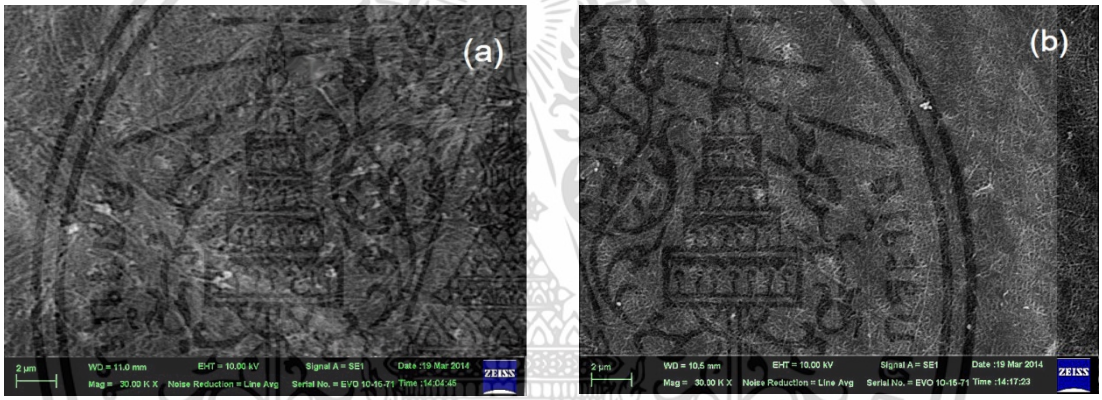
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	มิลลิเมตร)	(ร้อยละ)	
กระดาษจากสูตรอาหารที่คัดเลือก (ชุดควบคุม)	36.64	2.55	2519.00
กระดาษจากสูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสม	98.79	7.87	812.60

หมายเหตุ

(1) ค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 5 ซ้ำ

(2) รายงานผลการทดสอบจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กระดาษจากสูตรอาหารที่คัดเลือก (ชุดควบคุม) **กระดาษจากสูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสม**

รูปที่ 4.15 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสูตรอาหารที่คัดเลือก (ชุดควบคุม) ก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และสูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะ ที่เหมาะสม ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 30,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเปลือกแตงโมโดยเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าวให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดคือ 3.16±0.12 กรัมต่อลิตร จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากสูตรอาหารที่คัดเลือกนี้ พบว่าการใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 5 ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.0 และไม่เติมเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดโดยให้ผลผลิตเซลลูโลส 5.30±0.25 กรัมต่อลิตร จากนั้นเปรียบเทียบการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสมกับอาหารคัดเลือกก่อนศึกษาสภาวะที่เหมาะสมพบว่า การหมักเซลลูโลสโดยใช้เชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP1 ในอาหารสูตรที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสมให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าสูตรอาหารคัดเลือกก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม 1.7 เท่า

จากนั้นผลิตกระดาษจากเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีผลผลิตเซลลูโลส 6.44±0.18 กรัมต่อลิตร และทดสอบคุณสมบัติเชิงกลของกระดาษเปรียบเทียบกับกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสูตรอาหารที่คัดเลือกก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (ชุดควบคุม)พบว่ากระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าวหมักในสภาวะที่เหมาะสม มีค่าความแข็งแรงดึง 98.79 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร และค่ายืด ณ จุดขาดร้อยละ 7.87 และมีค่ามอดูลัสของยังส์ 812.60 นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร จากนั้นศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่ามีเส้นใยขนาดเล็กจำนวนมากเชื่อมกันเป็นร่างแหอย่างหนาแน่น เมื่อเปรียบเทียบกับกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสูตรอาหารที่คัดเลือกก่อนนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม พบว่ามีลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสไม่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ มะกรวัฒนะ สุริศา เกษกราน และสิทธิชัย มาตรนอก. 2551. การผลิตกระดาษวุ้นมะพร้าวโดยเชื้อ *Komagataeibacter* sp. และนำกระดาษที่ได้มาประยุกต์ใช้. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ฐานันดร์ ฟ้าประทานชัย ภาคภูมิ สร้อยสั้น และสุรนารถ อร่ามเรือง. 2546. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกระดาษโดยแบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter xylinum* TISTR 976. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Bae, S. and Shoda, M. 2005. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production using Box-Behnkendesign. Biotechnology Bioengineering. 90: 20-28.

Brown, R.M., Willison, J.H.M., and Richardson, C.L.1976. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum* : visualization of the synthesis and direct measurement of the in vivo process. Proc. Notl. Acad. Science USA. 73: 4,565-4,569.

Brown, A.J. 1886. On an acetic ferment which forms cellulose. Journal Chemistry Soc. Trans. 49: 432-439.

Budhiono, A., Rosidi, B., Taher, H. and Iguchi, M. 1999. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. Carbohydrate Polymers. 40: 137-143.

Carreira, P., Mendes, J. A. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D. and Pascoal Neto, C. 2011. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. Journal of Bioresource Technology.10215) 7354-7360.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Castro, C., Zuluaga, R., Alvarez, C., Putaux, J.L., Caro, G., Rojas, O.J., Mondragone, I. and Ganan, P. 2012. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. Carbohydrate Polymers. 89: 1033-1037.

Chawla, P.R., Bajaj, I.B., Survase, S.A. and Singhal, R.S. 2009. Microbial cellulose: fermentative production and applications. Food Technology Biotechnology. 47(2): 107-124.

Hestrin, S. 1947. Synthesis of cellulose by resting cells of *Acetobacter xylinum*. Nature. : 64-65.

Hwang, J.K., Yang, Y.K., Pyun, Y.R. and Kim, Y.S. 1999. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRCS in agitated culture. Journal of Bioscience and Bioengineering. 88(2): 183-188 .

Jagannath, A., Kalaiselvan, A., Manjunatha, S.S., Raju, P. S. and Bawa, A.S. 2008. The effect pH, sucrose and ammonium sulphate concentrations on the production of bacterial cellulose (Nata-de-coco) by *Acetobacter xylinum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24: 2593-2599.

Johnson, D.C. and Neogi, A.N. 1989. Sheeted products formed from reticulated microbial cellulose. US patent: 4863565.

Jonas, R. and Farah, L.F. 1998. Production and application of microbial cellulose. Polymers Degrad. Stabil. 59: 101-106.

Keshk, S.M.A.S. and Sameshima, K. 2005. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. African Journal of Biotechnology. 4: 478-482.

Kim, S.Y., Kim, J.M., Wee, Y.J., Park, D.H. and Ryn, H.W. 2006. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter* sp RKYS isolate from persimmon vinegar. Applied Biochemistry and Biotechnology. 6: 705-710.

Kongruang, S. 2008. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. Applied Biochemistry and Biotechnology. 148: 245-256.

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

Krusong, W., Phainyo, N. and Yoshida, T.1998. Counteraction of negative effect on cellulose production in agitated submerged culture of *Acetobacter xylinum*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Asian network microbial resarches : Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia. 521-527.

Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y., and Nakamura, Y. 2009. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. Carbohydrate Polymers. 76: 333-335.

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

Li, Y., Chen, X.G., Liu, N., Liu, C.S., Liu, C.G., Meng, X.H., Yu, L.J., Kenendy, J.F. 2007. Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. Carbohydrate Polymers. 67: 227-232.

Masaoka, S., Ohe, T. and Sakota, N.1993. Productiom of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 75: 18-22.

Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H. and Yoshinaga, F.1998. Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. Journal of Fermentation and Bioengineering. 85(6): 598-603.

Ochaikul, D., Rukchonlatee, S., Naranong, N. and Pongsakul, P. 2009. Effect of chitosan on paper production from bacterial cellulose and its properties. Faculty of science, King Mongkut's Institute of Technology.

Ochaikul, D., Rukchonlatee, S., Soisant, P., Aramruang S. and Fapratanchai, T. 2004. Paper production and properties from bacterial cellulose *Acetobacter xylium* TISTR 967.

Internationnal Conference on Engineering, Applied Sciene, and Technology, Bangkok, Thailand.

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

Raghunathan, D. 2013. Production of microbial cellulose from the new bacterial strain isolated from temple wash waters. International Journal of Current Microbiology and Applied Science. 2(12): 275-290.

Schramm, M. and Hestrin, S.1954. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. Journal of General Microbiology. 11: 123-129.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shirai, A., Takahashi, M., Kaneko, H., Nishimura, S.,Ogawa, M., Nishi, N. and Tokura, S. 1994. Biosynthesis of a novel polysaccharide by *Acetobacter xylinum*. International Journal of Biology Macromolecules. 16: 297-300.

Slusarska, B., Presler, S. and Danielewicz, D. 2007. Characteristics of bacterial cellulose obtained from *Acetobacter xylinum* culture for application in papermaking. Fibres and Textiles in Eastern Europe. 16(4).

Sun, D.P., Zhang, J.D., Zhou, L.L., Zhu, M.Y., Wu, Q.H. and Xu, C.Y. 2005. Production of bacterial cellulose with *Acetobacter xylinum* 1812 fermentation. Journal of Nanjing University Science Technology. 29: 601-604.

Suwannapinunt, N., Burakorn, J. and Thaenthanee, S. 2007. Effect of culture condition on bacterial cellulose (BC) production from *Acetobacter xylinum* TISTR 976 and Physical properties of BC parchment paper. Suranaree Journal of Science and Technology. 14(4).

Suwanposri, O., Yukphan, P., Yamada, Y., and Ochaikul, D. 2012. Identification and biocellulose production of *Gluconacetobacter* strains isolated from tropical fruits in Thailand. Maejo International Journal of Science and Technology. 7(01): 70-82.

Toda, K., Asakura, T., Fukaya, M., Entani, E. and Kawamura, Y. 1997. Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 84: 225-231.

Trovatti, E., Serafim, S. L., Freire, S.R.C., Silvestre, J.D.A., Neto, P.C. 2011. *Gluconacetobacter sacchari* : An efficient bacterial cellulose cell–factory. Carbohydrate Polymers. 86: 1417-1420.

Verschuren, P.G., Cordona, T.D., Nout, R.M.J., De GooiJer, K.D., and Van Den Heuvel, J.C.2000. Location and limitation of cellulose production by *Acetobacter xylinum* established from oxygen profiles. Journal of Bioscience and Bioengineering. 89(5): 414-419.

Watanabe, K. and Yamanaka, S.1995. Effect of oxygen tension in gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture condition. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 59(1): 65-68.

Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y. and Yoshinaga, F. 1998. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. Cellulose: 5187-200.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Yamanaka, S. and Watanabe.1994. Applications of bacterial cellulose. In. Gilbert, R.D. (ed.), Cellulose polymers, blends and composites. Hanser/Gardner. Cincinnati: 207-215.

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

Yodsuwan, N., Owatworakit, A., Ngaokla, A., Tawichai, N. and Soykeabkaew, N. 2012. Effect carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production for bionanocomposite. Mae Fah Luang University International Conference.

Zakaria, J. and Nazeri, A.M. 2012. Optimization of bacterial cellulose production from pineapple wastes : effect of temperature, pH and concentration. Faculty of Chemical and Natural Resources Engineering University Malaysia Pahang.

[Online].Available : http://www.wileyvch.de/books/biopoly/pdf_v05/bpol5003_37_46.pdf (30 มิถุนายน 2556)

[Online].Available : http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2554/biol20454sp_ch2.pdf (2 กรกฎาคม 2556)

[Online].Available : http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2553/envs21253ss_ch2.pdf (2 กรกฎาคม 2556)

[Online].Available : http://coursewares.mju.ac.th:81/elearning47/section2/ch351/download/ir.pdf (2 กรกฎาคม 2556)

[Online].Available : http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/nano/Page/Unit4-5.html (2 กรกฎาคม 2556)

[Online].Available : http://www.vcharkarn.com/project/upload/0/600_2.pdf (2 กรกฎาคม 2556)

[Online].Available : http://www.mfu.ac.th/center/stic/index.php/micro-analysis-instrumentmenu/item/96-scaning-electron-microscrope.html (2 กรกฎาคม 2556)

[Online].Available : http://www.adirek.com/stwork/fruitvet/tangmo.html (9 ตุลาคม 2556) [Online].Available : http://www.khaotan.com/history.html (9 ตุลาคม 2556)

[Online].Available : http://www.sahavicha.com/?name=knowledge&file=

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

readknowledge&id =2093 (9 ตุลาคม2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้