การคัดเลือกจุลินทรีย์สร้างเซลลูโลส *Acetobacter* sp. จากวัตถุดิบผลไม้ในเขตร้อนและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส

SCREENING OF BACTERIAL CELLULOSE-PRODUCER *Acetobacter* sp. FROM TROPICAL FRUIT RESOURCES AND SUITABLE CONDITION FOR CELLULOSE PRODUCTION

ลำเพียง พุ่มจันทร์

LAMPHUNG PEUMJAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2545

ISBN 974-648-217-8

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter* sp. จากตัวอย่างผลไม้ในเขตร้อนและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส

SCREENING OF BACTERIAL CELLULOSE-PRODUCER *Acetobacter* sp. FROM TROPICAL FRUIT RESOURCES AND SUITABLE CONDITION FOR CELLULOSE PRODUCTION

T049649

ลำพึง พุ่มจันทร์

LAMPHUNG PHUMJAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2545

ISBN 974-648-917-8

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 49649
วัน, เดือน, ปี 25 ก.พ. 2547

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SCREENING OF BACTERIAL CELLULOSE-PRODUCER *Acetobacter* sp. FROM TROPICAL FRUIT RESOURCES AND SUITABLE CONDITION FOR CELLULOSE PRODUCTION

LAMPHUNG PHUMJAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2002

ISBN 974-648-917-8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2002
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter* sp. จากตัวอย่างผลไม้ในเขตร้อนและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส
SCREENING OF BACTERIAL CELLCULOSE-PRODUCER *Acetobacter* sp. FROM TROPICAL FRUIT RESOURCES AND SUITABLE CONDITION FOR CELLULOSE PRODCUTION

ชื่อนักศึกษา นางสาวลำพึง พุ่มจันทร์

รหัสประจำตัว 38064203

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.สุขใจ	ชูจันทร์	
รศ.ดร.วราวุฒิ	ครูส่ง	
รศ.ดร.นวลพรรณ	ณ ระนอง	
รศ.อรไท	สุขเจริญ	
ผศ.ดวงใจ	โอชัยกุล	

วัน/เดือนปี ที่สอบ 22 พฤษภาคม 2545 **เวลา** 13.30 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4 ห้อง 424

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.บุญวัฒน์ อัตชู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 19 **เดือน** มิถุนายน **พ.ศ.** 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter* sp. จากตัวอย่างผลไม้ในเขตร้อนและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส
นักศึกษา	นางสาวลำพึง พุ่มจันทร์
รหัสประจำตัว	38064203
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2545
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Acetobacter* sp. ที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้ เพื่อพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเซลลูโลสในปริมาณสูง โดยทำการแยก *Acetobacter* sp. จากผลไม้ในเขตร้อนที่เน่าเสีย ได้แก่ สับปะรด องุ่น และเงาะ ได้จำนวนเชื้อทั้งหมด 450 ชนิด ซึ่งนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลสเบื้องต้นและสามารถผลิตเซลลูโลสได้จำนวน 106 ชนิด โดยมีแหล่งจากสับปะรด องุ่น และเงาะ จำนวนตัวอย่าง 25 26 และ 65 ชนิด ตามลำดับ ทั้งนี้สามารถแยกการสร้างเซลลูโลสได้สูงสุดจำนวน 18 ชนิด โดยได้จำแนกเป็นชนิดของ *Acetobacter* sp. ได้จำนวน 11 ชนิด จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญในอาหาร BSH medium ที่สภาวะนิ่งและที่สภาวะเขย่าของเชื้อในการสร้างเซลลูโลส พบว่าที่สภาวะนิ่งเชื้อ *Acetobacter* sp. จำนวน 4 ชนิดที่สร้างเซลลูโลสได้สูงสุดโดยการเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตได้ต่อปริมาตรน้ำหมักที่ใช้ ได้แก่ *Acetobacter* sp. รหัส C7-10 C8-16 C7-3 และ C8-3 จากการศึกษาที่สภาวะเขย่าในฟลาสก์พบว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. รหัสC7- 10 C8-16 C7-3 และ C8-3 ซึ่งเป็นเชื้อชนิดเดียวกับที่ศึกษาในสภาวะนิ่ง สามารถสร้างเซลลูโลสได้สูงแต่ปริมาณเซลลูโลสที่ได้มากกว่าในสภาวะนิ่ง และพบว่าเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ดีทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าคือ *Acetobacter* sp. รหัส C7- 10 สามารถผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งได้ 0.1450 และ 0.1924 กรัมต่อน้ำหมักที่ใช้ 100 มล.ตามลำดับ เมื่อนำไปศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าฟลาสก์ที่สภาวะเขย่าที่เหมาะสมกับการผลิตเซลลูโลสของความเร็วรอบที่แตกต่างกัน ได้แก่ 50 100 150 และ 200 รอบต่อนาที พบว่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงสุดและเชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงสุด ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acetobacter sp. รหัสที่ C7- 10 ผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งได้ 0.1637 กรัมต่อน้ำหมัก 100 มล. เช่นกัน

การศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโลสที่ใช้ในการผลิตเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร BSH medium นั้น โดยศึกษาน้ำตาลกลูโคส 1 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับอาหาร BSH medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการสร้างเซลลูโลสได้น้อยกว่าสูตรน้ำตาลปกติ 2 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเชื้อที่สามารถใช้น้ำตาลในการสร้างเซลลูโลสได้ดี คือ C7-10 ดังนั้นจึงได้นำไปศึกษาในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรน้ำหมักที่ใช้ Coconut water จำนวน 2500 มล. โดยมีการกวนให้อากาศด้วยใบพัดความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เท่ากับความเร็วรอบในการเขย่า ฟลาสก์ ปริมาณเซลลูโลสน้ำหนักแห้งที่ผลิตได้จำนวน 0.1800 กรัม/ลิตร ส่วนที่สภาวะเขย่าจาก Coconut water ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เชื้อ *Acetobacter* sp. รหัสที่ C7- 10 ผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งจำนวน 1.727 กรัม/ลิตร เมื่อเทียบปริมาตรน้ำหมักในอัตราส่วนที่เท่ากัน

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis title	Screening of Bacterial Cellulose-producer *Acetobacter* sp. from Tropical Fruit Resources and Suitable Condition for Cellulose Production
Student	Miss Lamphung Pumjan
Student ID	38064203
Programme	Master of Science
Year	2002
Advisor	Assoc.Prof.Dr.Warawut Krusong
Co-Advisor	Assoc.Prof.Dr.Nuanphan Na-Ranong

ABSTRACT

Screening of Bacteria Cellulose producing for *Acetobacter* strains were from rotting fruit: pineapple,grape and rambutan. The bacteria isolated 450 bacteria were found,only 106 colonies could produce cellulose from pineapple, grape and rambutan for 25 26 and 65 colonies respectively.The The 18 bacteria which screened were selected as high cellulose producer .The 11 of them were identified as strains of *Acetobacter* .However ,the 18 selected culture were futher tested for their cellulose production in BSH medium under static and shaken in tube and flask condition. Under static culture,the yield of cellulose produced were not different between cultivated under static and shaken conditions.

Cellulose product on screened *Acetobacter* 11 species isolated were estimated by culture under static and shaken condition .Among these *Acetobacter* species,isolated code C7-10 showed the highest cellulose production, follow by C8-16 C7-3 and C8-3 in static condition.These strains showed the same result in shake condition.

No correlation between amount of cellulose accumulated in static and shaken cultivation was found. However, there were some strains showed high cellulose content when cultivated in shaken condition. The high isolate code C7-10 of *Acetobacter* strain could produce cellulose 0.1450 and 0.1924 g. (dw/100ml.) from static and shaken conditions respectively. Among shaking speed for cellulose production, the suitable speed for cellulose production, the suitable speed for cellulose production was 100 rpm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

In the study used glucose as carbon source for cellulose production and this found the maximum cellulose production was obtained when it was grow in BSH medium containing 2% glucose, and its optimum culture condition. Investigation, the yield of cellulose production decreased with increasing glucose production concentration and the highest cellulose producer is Isolate code C7-10. It is thought that this organism produce cellulose in 5 lite jar fermentor using coconut water and add with 1% glucose, the product 0.1800 g. (dw/l.).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความกรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็นและคำแนะนำอันมีค่าและเป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้าตลอดเวลาในการทำวิจัย ทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขและให้คำแนะนำเพิ่มเติม ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ และ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล ที่กรุณาให้เกียรติเป็นประธานและคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์อีกทั้งช่วยตรวจสอบและแก้ไข พร้อมทั้งให้คำแนะนำจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.อรไท สุขเจริญ ที่ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกในการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งให้คำแนะนำ แก้ไข จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล. ที่เป็นกำลังสำคัญ พร้อมทั้งคำแนะนำต่างๆ แก่ข้าพเจ้าเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ดร.ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ที่ให้ความช่วยเหลือและให้ความรู้เกี่ยวกับเครื่องถังหมักในการทำวิทยานิพนธ์ครั้ง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคน ที่เป็นกำลังใจและกำลังกายในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณแม่และครอบครัว ที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนในการศึกษาด้วยดีตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ บิดา มารดา ครู อาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ข้าพเจ้าขอน้อมรับไว้แต่เพียงผู้เดียว

ลำพึง พุ่มจันทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

สารบัญ.....VI

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญภาพ.....VIII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 ผลไม้.....3

2.2 เซลลูโลส.....4

2.3 แบคทีเรียเซลลูโลส.....7

2.4 แหล่งที่มาของเชื้อเซลลูโลส.....8

2.5 คุณสมบัติทั่วไปของเชื้อ *Acetobacter*.....9

2.6 คุณสมบัติที่ใช้ในการแยกเชื้อ *Acetobacter*.....10

2.7 ลักษณะทางกายภาพและการเจริญเติบโตของเชื้อ *Acetobacter*.....11

2.8 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส.....13

2.9 วิธีการทำให้เซลลูโลสบริสุทธิ์.....20

2.10 การแยกเชื้อจุลินทรีย์.....21

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....24

3.1 จุลินทรีย์.....24

3.2 เคมีภัณฑ์.....24

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง.....24

3.4 เครื่องแก้วและอุปกรณ์.....25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

3.5 วิธีการทดลอง.....25

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....28

4.1 การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของ.....28
Bacterial Cellulose (BC)

4.2 การศึกษาระยะเวลาการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *A.xylinum* DK.....29

4.3 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter* sp.จากธรรมชาติ.....30

4.4 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียเซลลูโลสที่สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า.....31
ในหลอดทดลองและระดับฟลาสก์

4.5 การศึกษาสภาวะความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส.....40

4.6 การศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลลูโลส.....44

4.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสในถังหมัก.....52

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....54

ข้อเสนอแนะ.....56

บรรณานุกรม.....61

ภาคผนวก.....62

ก. วิธีวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์.....63

ข. องค์ประกอบและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....78

ค.ข้อมูลจากการทดลอง.....79

ประวัติผู้เขียน.....89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติในการจัดจำแนกชนิดของ Bacterial Cellulose	10
4.1	แหล่งคาร์บอนที่เชื้อ *A. xylinum* ใช้ในการผลิตเซลลูโลส	14
4.1	การเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสจากสูตรอาหารต่างๆ ปริมาณน้ำหมัก 500 มล.	28
4.2	ผลการทดสอบชีวเคมีในการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส	32
4.3	การสร้างเซลลูโลสจากอาหาร BSH medium ในหลอดทดลอง โดย *Acetobacter* sp.ที่คัดเลือกได้	33
4.4	การสร้างเซลลูโลสจากอาหาร BSH medium ในฟลาสก์ โดย *Acetobacter* sp.ที่คัดเลือกได้	37
4.5	ผลความเร็วรอบต่างๆ ในการเขย่าฟลาสก์ที่มีต่อการสร้างวุ้นเซลลูโลสทั้งหมด จากอาหาร BSH-medium โดย *Acetobacter* sp.ที่คัดเลือกได้	41
4.6	ผลความเร็วรอบต่างๆ ในการเขย่าฟลาสก์ที่มีต่อการสร้างเซลลูโลสทั้งหมด จากอาหาร BSH-medium โดย *Acetobacter* sp.ที่คัดเลือกได้	42
4.7	ปริมาณน้ำหนักแห้งทั้งหมดของการสร้างวุ้นเซลลูโลสทั้งหมดจากความเข้มข้น ของน้ำตาลกลูโคส ปริมาณต่างๆ ที่สภาวะนิ่ง โดย *Acetobacter* sp.	46
4.8	ปริมาณน้ำหนักแห้งทั้งหมดของการสร้างเซลลูโลสจากความเข้มข้นของน้ำตาล กลูโคส ปริมาณต่างๆ ที่สภาวะนิ่ง โดย *Acetobacter* sp.	47
4.9	ปริมาณน้ำหนักแห้งทั้งหมดของการสร้างวุ้นเซลลูโลสทั้งหมดจากความเข้มข้น ของน้ำตาลกลูโคส ปริมาณต่างๆ ที่สภาวะเขย่า 100รอบ/นาที โดย *Acetobacter* sp.	50
4.10	ปริมาณน้ำหนักแห้งทั้งหมดของการสร้างเซลลูโลสจากความเข้มข้นของน้ำตาล กลูโคส ปริมาณต่างๆ ที่สภาวะเขย่า โดย *Acetobacter* sp.	51
4.11	ปริมาณการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. ในถังหมักขนาด 5 ลิตร	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
1	ข้อมูลจากการทดลอง	79
ค.2	การผลิตเซลลูโลสในหลอดทดลองบรรจุอาหาร BSH medium 5 มล	84
ค.3	การสร้างเซลลูโลสจากแบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter* sp.ในฟลาสก์บรรจุอาหาร BSH medium 100 มล.	85
ค.4	เปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตจากน้ำหมักปริมาตร 100 มล ที่สภาพการเขย่า 50 รอบ/นาที และ 100 รอบ/นาที	86
ค.5	เปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตจากน้ำหมักปริมาตร 100 มล ที่สภาพการเขย่า 150 รอบ/นาที และ 200 รอบ/นาที	87
ค.6	การเปรียบเทียบน้ำตาลกลูโคสปริมาณต่างๆ ในการสร้างเซลลูโลส	88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างและการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลส	5
2.2	การเชื่อมโยงโมเลกุลด้วยพันธะไฮโดรเจน	6
2.3	การจัดเรียงตัวโครงสร้างของเซลลูโลส	6
2.4	รูปร่างลักษณะของเชื้อ *A. xylinum* และโครงสร้างการจัดเรียงตัวเป็นเส้นสาย	9
2.5	วงจรการสร้างเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum*	18
4.1	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *A. xylinum* DK	29
4.2	ผลของการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp. ที่สภาวะนิ่งในหลอดทดลอง	34
4.3	ผลของการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp. ที่สภาวะเขย่าในหลอดทดลอง	35
4.5	ผลของการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp. ที่สภาวะนิ่งในฟลาสก์	38
4.5	ผลของการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp. ที่สภาวะเขย่าในฟลาสก์	39
4.6	ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อปริมาณการสร้างเซลลูโลส	43
4.7	ผลของปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่อการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp. ที่สภาวะนิ่งในฟลาสก์	48
4.8	ผลของปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่อการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp. ที่สภาวะเขย่าในฟลาสก์	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เซลลูโลสเป็นสารที่มีความสำคัญกับอุตสาหกรรมหลาย ๆ ประเภท ซึ่งเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสส่วนใหญ่สกัดได้จากแหล่งที่มาจากธรรมชาติ โดยเฉพาะพืช บางครั้งมีข้อจำกัดในการผลิตได้เซลลูโลสที่ไม่บริสุทธิ์ หรือวิธีการทำให้บริสุทธิ์มีความยุ่งยาก แต่ปัจจุบันพบว่าเซลลูโลสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะกลุ่มของแบคทีเรียที่ศึกษากันในขณะนี้ ได้แก่ กลุ่มของแบคทีเรียที่ชื่อว่า แบคทีเรียเซลลูโลส และที่นิยมศึกษากันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ แบคทีเรีย *Acetobacter* ซึ่งพบว่าเป็นกลุ่มที่ให้ผลผลิตของเซลลูโลสบริสุทธิ์ในปริมาณที่สูงสุด แต่ในปัจจุบันพบว่าการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter* ประสบปัญหาอันเนื่องมาจากการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการผลิต ตลอดจนขบวนการผลิตและควบคุมคุณภาพของเซลลูโลสมีความไม่แน่นอนทำให้การผลิตไม่คงที่ อย่างไรก็ตามในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่การผลิตเซลลูโลสจะเป็นแบบกะ หรือที่สภาวะนิ่ง ซึ่งใช้เวลาในการหมักนานและสิ้นเปลืองแรงงาน ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนานำระบบการกวนมาใช้ในการผลิต ซึ่งก่อนที่จะทำการผลิตจะต้องมีการศึกษาวิจัยหาสายพันธุ์ของเชื้อให้เหมาะสมกับการเจริญในระบบการกวน แต่จากการศึกษาพบว่าการผลิตที่ได้นั้นน้อยกว่าการหมักที่สภาพนิ่ง (Yamanaka, 1989 ; Schramm and Hestrin, 1954) ทั้งนี้เนื่องจากมีสายพันธุ์บางสายพันธุ์เท่านั้นที่เหมาะสมกับการหมักในสภาพกวน

ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้กำหนดวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียเซลลูโลสในกลุ่มของ *Acetobacter* เพื่อนำมาใช้ในการผลิตและวิเคราะห์เซลลูโลส โดยศึกษาที่สภาพนิ่ง สภาพเขย่าในฟลาสก์ ทั้งนี้คาดว่าน่าจะได้สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตที่ดีสำหรับใช้ในการแยกเชื้อจากแหล่งธรรมชาติเพื่อพัฒนาสู่ระบบถังหมักที่ดีต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลสสายพันธุ์ *Acetobacter* sp. ที่สามารถผลิตเซลลูโลสจากผลไม้เน่าเสีย

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของแบคทีเรียเซลลูโลสสายพันธุ์ *Acetobacter* sp. ที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสในปริมาณสูง

1.2.3 เพื่อผลิตเซลลูโลสให้ได้ปริมาณสูงในสภาพการกวนที่เหมาะสมในถังหมัก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้จากผลไม้เน่าเสีย โดยศึกษาการสร้างเซลลูโลสในอาหารเหลวเพื่อผลิตเซลลูโลสซึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เจริญที่สภาวะนิ่ง สภาวะเขย่า เพื่อนำไปขยายการผลิตเซลลูโลสในถังหมัก และเป็นแนวทางในการขยายขนาดการผลิตที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผลไม้

ผลไม้ในทางพฤกษศาสตร์ หมายถึง ส่วนของรังไข่ (ovary) ที่เจริญโตเต็มที่ ซึ่งอาจจะเป็นรังไข่เดี่ยวหรือหลายรังไข่ก็ได้ และในบางกรณีจะมีส่วนอื่นของดอกเจริญขึ้นมาเป็นส่วนของผลด้วย ในบางครั้งส่วนของดอกเหล่านี้อาจจะกลายเป็นส่วนหลักของผลก็มี เช่น ในผลสับปะรด มะม่วงหิมมะพานต์และสตรอเบอรี่ เป็นต้น

ผลไม้สามารถจำแนกได้หลายวิธีด้วยกัน (อรรณพ วราอัศวปติ. 2532) เช่น

1. จำแนกตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงอัตราการหายใจของผลไม้ในขณะผลแก่หรือสุก แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ผลไม้บ่มสุก (climacteric fruit) เป็นกลุ่มผลไม้ที่มีอัตราการหายใจเพิ่มสูงในขณะที่ผลไม้เริ่มแก่หรือสุก และผลไม้บ่มไม่สุก (non-climacteric fruit)

2. จำแนกตามสภาพดินฟ้าอากาศที่พืชเจริญได้ดี โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ

- ผลไม้เขตร้อน (tropical fruit) ได้แก่ กล้วย มะม่วง มังคุด ทุเรียน สับปะรด มะละกอ เงาะ ฯลฯ
- ผลไม้เขตกึ่งร้อน (subtropical fruit) ได้แก่ ส้ม ลำไย ลิ้นจี่ และกระทกรกฝรั่ง
- ผลไม้เขตอบอุ่น (temperate fruit) ได้แก่ แอปเปิล สาลี่ ท้อ และพลับ เป็นต้น

3. จำแนกตามลักษณะส่วนประกอบทางพฤกษศาสตร์ของรังไข่ โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ผลเดี่ยว (simple fruit) ได้แก่ มะม่วง ทุเรียน ผลกลุ่ม (aggregate fruit) ได้แก่ สตอเบอรี่ น้อยหน่า และผลรวม (multiple fruit) ได้แก่ ขนุน สาเก สับปะรด

2.1.1 การปนเปื้อนผลไม้จากจุลินทรีย์

พืชชนิดต่างๆ ที่กำลังเจริญเติบโตจะพบว่ามีจุลินทรีย์อยู่ที่ผิวด้วยเสมอ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะสามารถเข้าไปภายในพืชได้ทันทีถ้าผิวของพืชเกิดความเสียหายขึ้น ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบบนผิวของพืชจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช ชนิดที่พบเสมอ ได้แก่ *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, โคลิฟอร์มแบคทีเรีย และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบพวก *Bacillus* spp. ยีสต์ และ ราชนิดต่างๆ ด้วย จำนวนของแบคทีเรียจะมีมากน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและสิ่งแวดล้อมของพืช ผักและผลไม้อาจมีการปนเปื้อนจากดิน น้ำ น้ำเสีย อากาศและสัตว์ ซึ่งจะทำให้มีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นไปอีก และถ้าสิ่งแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญก็จะมีการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์มากขึ้น (สุมาลี เหลืองสกุล. 2527)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เซลลูโลส

ผลไม้มีคาร์โบไฮเดรต หรือ พอลีแซคคาไรด์ เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (cell wall) โดยผนังเซลล์ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพคตินและลิกนิน

เซลลูโลสเป็นสารประกอบหลักที่สำคัญของผนังเซลล์ พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วๆ ไปโดยเฉพาะในเซลล์พืชต่างๆ และมีปริมาณที่แตกต่างกันตามชนิด อายุ และส่วนต่างๆ กันของพืช พบมากในผัก ผลไม้ ธัญพืช (วิภา สุโรจนะเมธากุล และคณะ. 2541) ไม้เนื้ออ่อน สน ยูคาลิปตัส ซึ่งในต่างประเทศจะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลสคุณภาพสูง นอกจากนี้ยังพบว่าวัสดุที่เหลือทิ้งจากการเกษตร เช่น หญ้า ฟางข้าว กากอ้อย สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลสได้ (กองวิจัย. 2531)

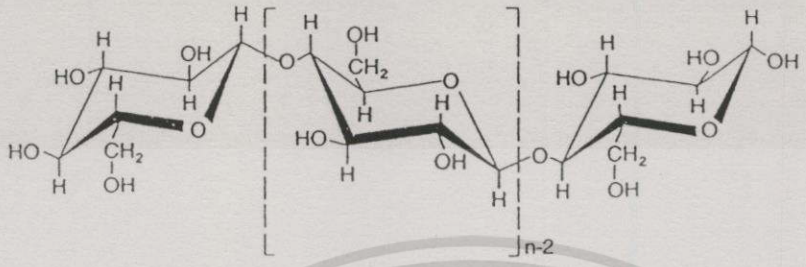
เซลลูโลสเป็นพอลีแซคคาร์ไรด์ชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วย D-glucose หลายๆ หน่วย ตั้งแต่ 15 ถึง 40,000 หน่วยมาต่อกันด้วยพันธะ β - 1,4 glucosidic bond เป็นพอลีเมอร์ แต่ละหน่วยย่อยของเซลลูโลส เรียกว่า anhydroglucose มีสูตรทางเคมี คือ $C_6H_{12}O_5$ ในแต่ละ anhydroglucose มีอนุมูล OH 3 หมู่ ซึ่งอนุมูลเหล่านี้จะเป็นตัวที่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นให้เกิดเป็นอนุพันธ์ และมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 1,500,000 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา โดยทั่วไปสามารถพบเซลลูโลสในลักษณะเป็นสารประกอบ ส่วนใหญ่ที่พบอยู่ในพืชสามารถนำมา สกัดเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ได้ นอกจากนี้ยังพบในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น รา สาหร่าย และแบคทีเรีย พันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลทำให้เซลลูโลสในธรรมชาติสามารถคงรูปอยู่ได้ (Ross *et al.* 1991) รูปโครงสร้างมีการจัดเรียงตัวในลักษณะแบบขนาน (parallel) จนกลายเป็นผลึก

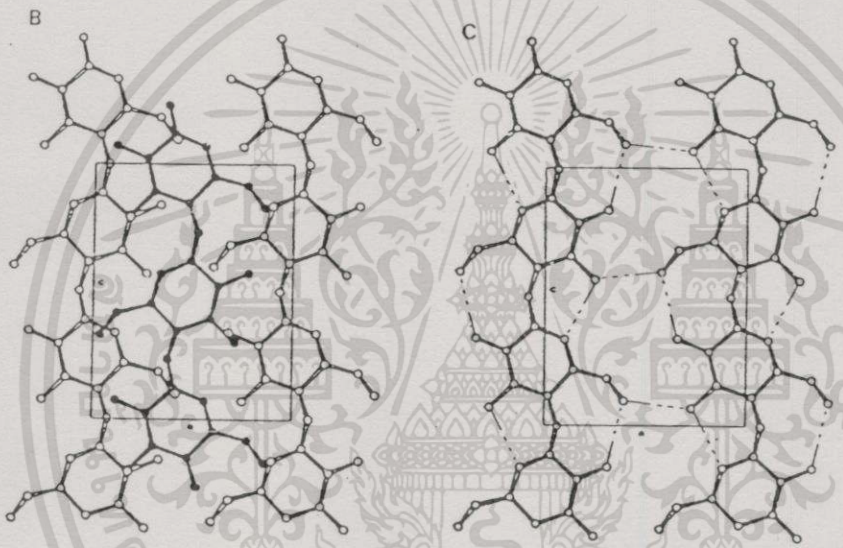
2.2.1 การจัดเรียงตัวทำให้เกิดโครงสร้างของเส้นใย

ในระดับ super molecular structure โดยส่วนที่เป็น crystalline micelles มีการจัดเรียงโมเลกุลอย่างเป็นระเบียบล้อมรอบอยู่ในตาข่ายของส่วนที่เป็นอสัณฐาน ซึ่งมีการจัดเรียงโมเลกุลไม่เป็นระเบียบ

เมื่อนำโมเลกุลของเซลลูโลสไปศึกษาโครงสร้างและการจัดเรียงตัวโดย electron microscope และ X-ray diffraction ดังแสดงภาพที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



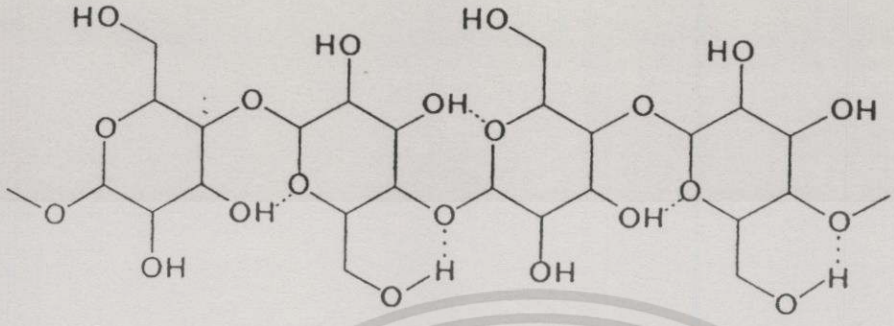


ภาพที่ 2.1 แสดงโครงสร้างและการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลส

ที่มา : Ross *et al.* (1991)

จากการจัดเรียงตัวแสดงว่ามีการเชื่อมโยงโมเลกุลด้วยพันธะไฮโดรเจน คือ กลุ่มของไฮดรอกซิลบนอะตอมคาร์บอนตัวที่ 3 (O-3) กับอะตอมของออกซิเจน pyronosring ตัวที่5 (O-5) ของหน่วยกลูโคสข้างเคียง และพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกลุ่ม (O-4) ไฮดรอกซิลบนอะตอมคาร์บอนตัวที่ 6 (O-6) ของหน่วยกลูโคสข้างเคียง (ดังแสดงภาพที่ 2.2)

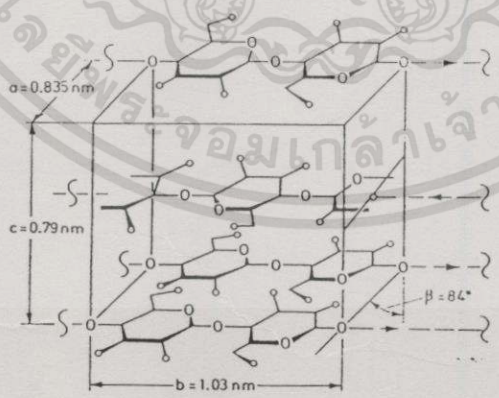
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 แสดงการเชื่อมโยงโมเลกุลด้วยพันธะไฮโดรเจน

ที่มา : Belitz and Grosch (1999)

พันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลจะทำให้สายโซ่ของเซลลูโลสยืดตรงและเกิดโครงสร้าง Two-fold screw axis ทำให้มีความเสถียรสูง ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสในธรรมชาติคงรูป นอกจากนี้พันธะไฮโดรเจนยังทำให้สายโซ่มีการจัดเรียงในลักษณะ parallel จนกลายเป็นผลึก ซึ่งการจัดเรียงตัวเช่นนี้ทำให้เกิดโครงสร้างของเซลลูโลสในระดับ super molecular structure (ดังแสดงภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 แสดงการจัดเรียงตัวโครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา : Belitz and Grosch (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิภา สุโรจนะเมธากุล และคณะ (2541) ได้นำกากของดอกกระเจี๊ยบและเปลือกถั่วเหลืองซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลิตผลทางการเกษตรมาทำให้บริสุทธิ์ และผลิตเป็นเซลลูโลสผง โดยผลการทดลอง พบว่า การสกัดด้วยสารละลายด่าง (NaOH) ที่ความเข้มข้น 12 และ 7 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้บรรยากาศก๊าซไนโตรเจนจะได้ปริมาณผลิตภัณฑ์จากเปลือกถั่วเหลืองและกากดอกกระเจี๊ยบคิดเป็น 39.16 และ 26.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการตรวจสอบลักษณะผงของเซลลูโลสโดยใช้เทคนิค SEM พบว่าเซลลูโลสที่ได้จากกากถั่วเหลืองส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก ผิวหน้าค่อนข้างเรียบ มีรูพรุนเล็กน้อย ส่วนเซลลูโลสที่ได้จากดอกกระเจี๊ยบมีรูปทรงไม่แน่นอนและมีรูพรุนมาก ซึ่งนำไปใช้เป็นข้อมูลในการผลิตเซลลูโลสบริสุทธิ์สำหรับการนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร และนำไปใช้ประโยชน์ในงานอุตสาหกรรมต่างๆ แต่ปัจจุบันพบว่าวัสดุที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลสมีความจำกัดและขึ้นอยู่กับสภาพดินฟ้าอากาศของแต่ละปี และยังมีการทำลายป่าเพิ่มขึ้นจึงทำให้วัตถุดิบที่จะใช้ในการสกัดลดลง จึงได้มีการศึกษาหาสิ่งทดแทนวัสดุที่สกัดจากพืช ปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากจุลินทรีย์ ซึ่งแบคทีเรียเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจอย่างมาก และเรียกแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตเซลลูโลสได้นี้ว่า แบคทีเรียเซลลูโลส และมีการศึกษากันอย่างขว้างขวางเพื่อทดแทนการสกัดเซลลูโลสจากพืชและนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ให้มากขึ้น

เซลลูโลส จัดเป็นใยอาหารชนิดหนึ่งที่ไม่ละลายน้ำ (Insoluble dietary fiber, IDF) ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ไม่ละลายในด่าง และตัวทำละลายเป็นส่วนใหญ่ (Deveries and Reinhold, 1992) เอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ แต่จะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่เพียงเล็กน้อย จัดได้ว่าเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย และเป็นแหล่งอาหารที่ไม่ให้พลังงานแต่เพิ่มกากอาหาร (ศศิเกษม ทองยง และพรรณี เดชกำแหง. 2530 ; ประภาศรี ภูวเสียร. 2532) ผลจากการศึกษาค้นคว้ายังเชื่อว่าเซลลูโลสจะช่วยดูดซึมสารก่อมะเร็ง (carcinogens) และช่วยป้องกันการดูดซึมของน้ำตาลกลับเข้าสู่ร่างกายได้ (สันทนา อมรไชย. 2537)

2.3 แบคทีเรียเซลลูโลส

ในปี 1886 Brown พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเซลลูโลสได้ และเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า Bacterial Cellulose (BC) Producer ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacte*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* และ *Sarcina* (Deinema and Zevenhuizen. 1971) โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตเส้นใยเซลลูโลส (cellulose microfibril) ออกมาภายนอกเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวและเจริญบนผิวหน้าอาหารมีการสร้างเส้นใยสีขาว (pellicle) ซึ่งประกอบกันเป็นเซลลูโลสในระหว่างที่มีการเจริญของเชื้อจะมีการสร้างเส้นใยไปพร้อมๆ กัน เมื่อระยะเวลาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญนานขึ้นก็จะมีปริมาณมากขึ้นจะสานและรวมตัวกันเป็นเส้นสายขุ่นขาวอยู่ในอาหารเหลวและจะค่อยๆ ลอยขึ้นสู่ผิวหน้าอาหาร เมื่ออยู่ที่ผิวหน้าอาหารเหลวจะเริ่มสานกันแน่นขึ้นเป็นแผ่นวุ้น มีลักษณะขุ่นมีความเหนียว ทั้งนี้ได้สันนิษฐานว่า การสร้างแผ่นวุ้นของเชื้อที่เกิดขึ้นนั้นเนื่องจากเชื้อที่ต้องการอากาศสามารถลอยตัวอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลวได้ เพื่อรับออกซิเจนให้ได้มากที่สุด (Schramn and Hestrin. 1954) นอกจากนี้ยังพบว่ามีบางชนิดที่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) ก็สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้เช่นกัน (Cook and Colvin. 1980) โดยเฉพาะเซลลูโลสที่สร้างโดย *Acetobacter* นั้น พบว่ามีความบริสุทธิ์ทางเคมีโดยปราศจากลิกนินและเฮมิเซลลูโลส

กลไกการสร้างเส้นใยเล็กๆ ที่ก่อเกิดเป็นเซลลูโลสในแบคทีเรียเซลลูโลสและปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์มีความแตกต่างด้านโครงสร้างของเซลลูโลสที่พบในพืช (Yamanaka *et al.* 1989 ; Ross *et al.* 1991) เซลลูโลสที่ได้จากการสังเคราะห์โดยแบคทีเรียมีการสร้าง 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกกลูโคสในรูปของโมเลกุลอิสระเข้าไปภายในเซลล์และรวมตัวกันเป็นสารตั้งต้น คือ พอลีกลูโคแซน โดยสารนี้จะถูกส่งผ่านออกมาภายนอกเซลล์ ขั้นที่สอง คือ สารพอลีเมอร์เหล่านี้จะรวมตัวกันทำให้เกิดเส้นใยขนาดเล็กๆ (microfibril) เมื่อมีจำนวนมากจะมีความแข็งมากขึ้น เซลลูโลสที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นเมือกและเป็นแผ่นวุ้นลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลวในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ (Colvin *et al.* 1977)

กรรมวิธีในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียเซลลูโลสส่วนใหญ่มักจะใช้การหมักแบบกะหรือในสภาพนิ่งและนำเส้นใยที่สร้างได้นั้นทำการแยกให้บริสุทธิ์

2.4 แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส

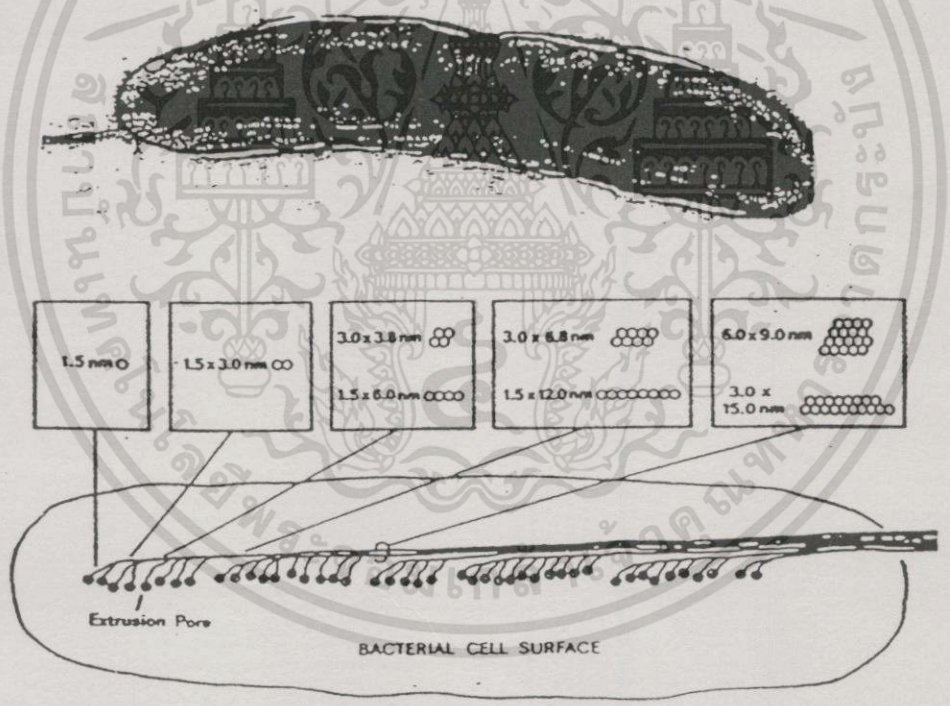
เชื้อในกลุ่มแบคทีเรียเซลลูโลสจะใช้เชื้อ *Acetobacter* เป็นตัวแทนในการศึกษาการสร้างเซลลูโลส และเป็นเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ปริมาณมาก สามารถพบได้ทั่วไปจากแหล่งต่างๆ เช่น บนผักและผลไม้ ไวน์ น้ำผลไม้ เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (Krieg and Holt. 1984) ผลไม้เน่าเสีย (rolting) เช่น มะม่วง ฝรั่ง สับปะรด ละมุด (Lapuz *et al.* 1967) ดอกไม้ ถั่ว ดิน (Seto *et al.* 1997 ; Toyosaki *et al.* 1995) อ้อย (Coronel and Joson 1986) น้ำผึ้ง นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อได้จากน้ำเสีย (activated sluge) (Dienema and Zevenhuizen. 1971)

ในปี 1861 ชาวฟิลิปปินส์ได้นำเชื้อแบคทีเรียมาหมักในน้ำมะพร้าว น้ำผลไม้ ซึ่งได้แก่ น้ำสับปะรด และตั้งทิ้งไว้จนเกิดแผ่นวุ้นหรือเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นเยื่อเหนียวมีลักษณะพิเศษและเรียกเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในน้ำมะพร้าวว่า nata de coco ส่วนเซลลูโลสที่ได้จากการหมักจากน้ำสับปะรดว่า nata de pina (Sanchez. 1990) และแบคทีเรียที่สร้างวุ้นเซลลูโลสนั้นว่า *Bacterium xylinum* ซึ่งต่อมาพบว่าเป็นเชื้อ *A. xylinum* (Brown. 1886)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 คุณสมบัติทั่วไปของเชื้อ *Acetobacter*

โดยทั่วไปแล้วเซลล์ของ *Acetobacter* มีหลายลักษณะ (very heterogeneous morphological) แต่ปกติจะพบในรูปท่อนสั้น (rod) ตรง หรือโค้ง ขนาด 0.6-0.8 ไมครอน x 1.0-1.4 ไมครอน อาจพบเซลล์อยู่เดี่ยวๆ จับคู่ หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ ซึ่งบางครั้งจะพบเซลล์ที่มีรูปร่างลักษณะที่ต่างจากที่กล่าวมา คือ อาจพบว่ามีลักษณะรูปร่างทรงกลม ยืดยาวบวม หรือรูปกระบอกบางตัวคล้ายดอกจิก โค้ง ไม่สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ระยะแรกของการเจริญส่วนใหญ่ติดสีแกรมลบ แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะติดสี Gram variable ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ แต่เมื่อเซลล์รวมอยู่กันมากๆ อาจมีสีชมพู เนื่องจากอิทธิพลของพอร์ไฟรินส์ (porphyrins) และบางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลได้



ภาพที่ 2.4 แสดงรูปร่างลักษณะของเชื้อ *A. xylinum*

ที่มา : Haigler and Chanzy (1988) ; Haigler (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 คุณสมบัติที่ใช้ในการแยกเชื้อ *Acetobacter*

แบคทีเรียสกุล *Acetobacter* จะมีปัญหาในการจัดจำแนกชนิด ทั้งนี้เนื่องจากมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันและยังมีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่มของ Bacterial Cellulose ตัวอื่น ๆ เช่น *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acrobacter*, *Agrobactoriam*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Rhizobium* และ *Sarcina* (Deinema and Zevenhuizen. 1971) ซึ่งได้จัดจำแนกลักษณะพิเศษต่าง ๆ ตาม Bergey's Manaul of Determinative Bacteriology (ดังตารางที่ 2.1) แสดงดังนี้

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติในการจัดจำแนกชนิดของ Bacterial cellulose

การทดสอบ/เชื้อ	*Acetobacter*	*Agrobacterium*	*Alcaligenes*	*Azotobacter*	*Pseudomonas*	*Rhizobium*	*Sarcina*
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	+
Cell shape							
Rods, or coccobacilli straight or curred	+	+	+	Ovoid	+	+	-
Cocci	-	-	-	-	-	-	+
Motility in liquid media	+ or -	+	+	+ or -	+ or -	-	-
Fluorescent pigment	-	-	-	+ or -	+ or -	-	
Yellow colonies	-	-	-	+ or -	+ or -	-	+
Red or orange colonies	-	-	-	-	+ or -		
Oxidase	-	+	+ or -	+ or -	+ or -	+ or -	
Acid from glucose	+	+	+		+ or -	+	
Oxdize ethanol to aceticacid at พีเอช 4.5	+	-	-		-	-	
Catalase test	+	+	+	+	+		-
Indole	-		-				-

ที่มา : Krieg (1984) ; Holt *et al.* (1994)

Acetobacter ส่วนใหญ่แล้วต้องการอากาศในการดำรงชีวิต (Obligate aerobes) *Acetobacter* ที่สามารถผลิตวุ้นได้จัดเป็นเชื้อที่เจริญในสภาพที่มีออกซิเจน (Cook and Colvin. 1980) แต่มีบางสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเมื่ออยู่ในสภาพที่เหมาะสม จะจัดเป็นพวก microaerophilic (William and Cannon. 1989) สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่ย่อยเจลลาติน ไม่สร้างอินโดล (indole) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ ออกซิไดส์เอทานอลเป็นกรดอะซิติก สามารถออกซิไดส์อะซิเตตและแลคเตรตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ลักษณะทางกายภาพและการเจริญเติบโตของเชื้อ *Acetobacter*

การเจริญเติบโตบนอาหารแข็งของ *Acetobacter* โคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งจะมีลักษณะเป็นทรงกลมนูน (pulvinate) สีขาว ผิวเรียบ แยกโคโลนีเดี่ยว ๆ ชัดเจน (Toyosaki *et al.* 1995) เมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีผิวขรุขระ หรือมีรอยย่น หรือสร้างโคโลนีซ้อนขึ้นมา ขุ่นเหนียว หรือสีน้ำตาลอ่อน ความเหนียวจะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น โคโลนีมีทั้งขนาดใหญ่และเล็ก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ

การเจริญในอาหารเหลวที่สภาวะนิ่ง เชื้อมีความต้องการอากาศในการเจริญและสร้างแผ่นวุ้นลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลวบางชนิดจะมีการฟอร์มเป็นเจลใต้แผ่นวุ้น แผ่นวุ้นจะมีผิวลื่นมีลักษณะขาวขุ่น (white-milk) เหนียว แผ่นวุ้นด้านล่างจะอ่อนนุ่มกว่าด้านบน

การเจริญที่สภาวะเขย่าในฟลาสก์ เป็นการเพิ่มออกซิเจน เชื้อจะเจริญและฟอร์มรูปร่างของเซลลูโลสเป็นเม็ดกลมๆ (pellet) ขนาดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ และอัตราความเร็วรอบในการเขย่า (Schramm and Hestrin. 1954)

Toyosaki *et al.* (1995) ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียเซลลูโลสที่สภาพเขย่าในฟลาสก์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างกันของเชื้อที่เจริญในฟลาสก์ที่มีลักษณะแตกต่างกันระหว่าง baffles flask กับ smooth flask พบว่าปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากการเขย่าใน baffles flask ให้ผลผลิตของเซลลูโลสมากกว่า smooth flask แต่อย่างไรก็ตามการฟอร์มตัวของเซลลูโลสที่เลี้ยงที่สภาวะเขย่าใน baffles flask จะมีลักษณะเป็น fine pellets นอกจากนี้ยังพบว่าการเขย่าในฟลาสก์อย่างต่อเนื่องสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อได้

Dudman (1960) ได้รายงานว่า การเลี้ยงในฟลาสก์ที่แตกต่างกันและตำแหน่งที่ตั้งของฟลาสก์ทำให้การผลิตที่ได้แตกต่างกันด้วย การเลี้ยงใน smooth flask เซลลูโลสที่ผลิตได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งก้อนโต แต่ใน baffles flask เซลลูโลสที่สร้างขึ้นเซลล์จะถูกกีดขวางและมีทั้งการเจริญและการสร้างเซลลูโลสพร้อมกัน และเกิดภาวะ phenomenon ขึ้น ลักษณะของฟลาสก์ที่วางตั้งตรงแบบธรรมดาของ baffle จะทำให้อาหารเหลวกระเด็นและเกิดฟอง

Somporn *et al.* (2002) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวโดย *A aceti* IFO3284 พบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญมี 2 ลักษณะ โดยมีลักษณะแบบ rough-surefaced colony (R stain) และ smooth-surefaced colony (S stain) โดยพบว่า S stain เจริญได้ดีในอาหารเหลวที่สภาวะนิ่งและที่สภาวะเขย่า

การกวนในถังหมักและการให้อากาศ มีรายงานการศึกษาและปรับปรุงสภาวะการเจริญของแบคทีเรียเซลลูโลสเพื่อให้มีการผลิตเซลลูโลสให้ได้ปริมาณมากขึ้น ซึ่งโดยส่วนใหญ่นั้นการผลิตในอุตสาหกรรมจะผลิตเซลลูโลสโดยเลี้ยงเชื้อในสภาพนิ่ง ซึ่งใช้พื้นที่ในการผลิตมากและสิ้นเปลืองแรงงาน จึงได้มีการพัฒนาเพื่อเพิ่มผลผลิตให้ได้ปริมาณมากและลดค่าใช้จ่ายการผลิต และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พื้นที่ในการผลิตให้น้อยลง โดยปรับปรุงสภาพการเจริญจากสภาพนิ่งเป็นแบบมีใบพัดกวนจนสู่ระบบถังหมัก (Toyosaki *et al.* 1995)

วิธีการผลิตเซลลูโลส มักพบปัญหาในขณะที่เจริญในอาหารจะเกิดความหนืด เนื่องจากเซลล์มีการสร้างเจลเกิดขึ้นทำให้ยากต่อการถ่ายเทออกซิเจน ดังนั้นการกวนและการให้อากาศจึงมีความจำเป็นในการผลิต ระบบการกวนใบพัดที่ใช้ในการกวนจะมีทั้งแบบ gate-shape turbine doulbe helical ribbon และ screw โดยทั่วไปการให้ออกซิเจนจะให้ผ่านทาง inner pressure ของถังหมัก แต่ปัจจุบันได้มีการให้ออกซิเจนในอาหารโดยตรง โดยมีการเสริมออกซิเจน ทาง gas phase (air bubbles) และพบว่าความดันของออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลส (Kouda *et al.* 2000)

Kouda *et al.* (1997) ศึกษาเปรียบเทียบชนิดของใบพัดที่ใช้กวนอาหารเหลวในถังหมักระหว่างการผลิตเซลลูโลสของ *A. xylinum* subsp *sucrofermentans* BPR3001A พบว่า ใบพัดแบบ Macblend และใบพัดแบบ Gate with turbine เหมาะสำหรับการกวนในถังหมัก เพราะทำให้อาหารและการเจริญผสมกันได้ดี ซึ่งทำให้เกิดความหนืดและปริมาณก๊าซออกซิเจนที่เหมาะสม

การผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter* อาจถูกยับยั้งได้จากการกวนในระหว่างการเจริญในถังหมัก ถึงแม้ว่ามีบางสายพันธุ์ที่เจริญได้ในสภาพกวน แต่ส่วนใหญ่แล้วพบว่าแบคทีเรียเซลลูโลสจะเจริญได้ดีและสร้างเส้นใยเป็นเซลลูโลสในสภาพนิ่งได้ดีกว่าการเลี้ยงในสภาพเขย่าในอาหารเหลว (Yoshino *et al.* 1996) ปัญหาการผลิตเซลลูโลสในสภาพกวนในถังหมักนั้นไม่ประสบผลสำเร็จในด้านที่จะผลิตให้ได้เซลลูโลสปริมาณที่สูงจากเดิมนั้น มีสาเหตุมาจากการที่เชื้อมีการเจริญไม่คงที่ จึงทำให้ผลผลิตไม่แน่นอน เนื่องมาจากที่เชื้อมีการเปลี่ยนน้ำตาลที่อยู่ในอาหารเป็นกรด-กลูโคนิกและคีโตกลูโคนิค (Yang *et al.* 1998) และยังพบว่าเมื่ออยู่ในใต้สภาวะการกวนในถังหมักมักจะเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ (mutant) ได้ง่าย

นอกจากสภาวะการเจริญของเชื้อแล้วการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียนั้นยังขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้ออีกด้วย ซึ่งปัจจุบันพบว่า *A. xylinum* subp *sucrofermentans* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงที่สุด และเมื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย Sulfaguanidine และ p-aminobenzoic acid (PABA) พบว่าจะทำให้มีผลผลิตเพิ่มขึ้นจากเดิม 40 เปอร์เซ็นต์ (Ishikawa *et al.* 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส

การเจริญของเชื้อที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ องค์ประกอบของอาหาร เครื่องมือ วิธีการเพาะเลี้ยง และองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

2.8.1 อุณหภูมิ

เชื้อ *Acetobacter* ส่วนใหญ่มีการเจริญและผลิตเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 10-40 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่าหรือสูงกว่านี้มากๆ เชื้อไม่สามารถเจริญได้ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมและเจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส (Kouda *et al.* 2000)

Lapuz *et al.* (1967) พบว่าการสร้างเซลลูโลสมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยการสร้างเซลลูโลสเกิดขึ้นได้เร็วเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดี และอุณหภูมิที่เจริญเติบโตของเชื้ออยู่ระหว่าง 28-32 องศาเซลเซียส

2.8.2 ความเป็นกรด-ด่าง

Acetobacter เจริญในอาหารที่มีพีเอช ระหว่าง 3.0-7.0 และเจริญได้ดีที่สุดอยู่ในช่วง พีเอช 4.0-5.0 (Kouda *et al.* 2000) และถ้าอาหารมีพีเอชต่ำกว่า 3.0 หรือสูงกว่า 8.0 จะไม่มีการสร้างเซลลูโลสเกิดขึ้น

Verschuren *et al.* (2000) ศึกษาการหมักที่สภาพนิ่ง โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นน้ำหมักและมีการเติมซูโครสลงไป โดยการศึกษาที่พีเอชต่างๆ กัน ได้แก่ พีเอช 3.0 4.0 5.0 และ 6.0 พบว่าที่พีเอช 4.0 และ 5.0 ให้ผลผลิตในการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* ได้มากที่สุด

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

Oikawa *et al.* (1995) ศึกษาการเจริญของ *A. xylinum* KU-1 ในอาหารสังเคราะห์ Standard medium ที่มีน้ำตาล D-Arabitol เป็นองค์ประกอบของอาหารที่พีเอชต่างๆ ได้แก่ 3.0-8.0 พบว่าที่พีเอช 5.0 เชื้อมีการเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ดีที่สุด

2.8.3 แหล่งคาร์บอน

เชื้อ *A. xylinum* สามารถใช้คาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ในการผลิตเซลลูโลส นอกจากกลูโคสแล้วยังสามารถใช้คาร์บอนจากแหล่งอื่นๆ ได้อีก เช่น ฟรุคโตส แมนนิทอล ซอร์บิทอล กลีเซอรอล กาแลคโตส แลคโตส ซูโครส มอลโตส (Hestrin 1947) ทั้งนี้เชื้อสามารถสร้างวุ้นได้จากเด็กโตรสและซูโครส เซลลูโลสที่ได้มีความหนาแน่นและแข็ง ดังนั้นจึงเลือกใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเนื่องจากหาง่ายและราคาไม่แพง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งของซูโครสจะอยู่ในรูปของแป้ง กากส้ม กากผักหวาน (beet) กากของผักหรือผลไม้ที่คัดแล้ว หรือชานอ้อย (Kouda *et al.* 2000)

Masaoka *et al.* (1993) ได้ศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณการใช้คาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส กลีเซอรอล และคาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ในปริมาณจำนวนเท่าๆ กัน คือ 0.3 กรัม/ฟลาสก์ ในอาหาร Standard medium โดยเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* ให้เจริญเป็นระยะเวลา 3 วัน แล้ววัดปริมาณเซลลูโลสที่ได้โดยนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่ามีการใช้แหล่งคาร์บอนได้จากแหล่งต่างๆ ในการผลิตเซลลูโลสในปริมาณที่ได้แตกต่างกันไป ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แหล่งคาร์บอนที่เชื้อ *A. xylinum* ใช้ในการผลิตเซลลูโลส

แหล่งคาร์บอน (Carbon source)		ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้ร้อยละ (Cellulose yield relative)
Monosaccharide	D-fructose	92
	D-galactose	15
	D-glucose	100
	D-manose	3
	D-xylose	11
	L-arabinose	14
	L-sorbose	11
Disaccharide	lactose	16
	moltose	7
	sucrose	33
Polysacchride	starch	18
Alcohols	ethanol	4
	ethylene glycol	1
	di-ethylene glycol	1
	propylene glycol	8
	glycerol	93
	mMyo-inositol	17
Organic acids	citric acid	20
	L-malic acid	15
	succinic acid	12
Other	D-glucono lactone	62
No carbon source		2

ที่มา : Masaoka *et al.* (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองของ Masaoka *et al.* (1993) พบว่าการสร้างเซลลูโลสของเชื้อนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตเซลลูโลสแล้ว ยังขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของอาหารเหลว ส่วนความลึกและปริมาณอาหารไม่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสเมื่อเลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่ง

Oikawa *et al.* (1995) ศึกษาเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* KU-1 ในอาหาร Standard medium และเปรียบเทียบการใช้น้ำตาล D-glucose กับ D-Arabitol ซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารในการเจริญเติบโตและเพื่อผลิตเซลลูโลส พบว่าเชื้อสามารถใช้น้ำตาล D-Arabitol ในการผลิตเซลลูโลสได้ดีกว่าการใช้น้ำตาล D-glucose โดยปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากน้ำตาล D-Arabitol จำนวน 12.4 มก./มล. และจากน้ำตาล D-glucose จำนวน 2 มก./มล.ตามลำดับ

Seto *et al.* (1996) ได้ศึกษาคัดเลือก *Acetobacter* ที่เหมาะสมเพื่อผลิตเซลลูโลสและใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีจากอาหาร CSL medium

2.8.4 **ออกซิเจน**

เป็นที่ทราบกันทั่วไปแล้วว่าการเจริญของแบคทีเรียเซลลูโลสที่เจริญที่สภาวะนิ่ง สภาวะเขย่า การให้อากาศ การกวนด้วยใบพัด ในการผลิตเซลลูโลสนั้น ตามปกติแบคทีเรีย *Acetobacter* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศหรือออกซิเจนในการเจริญเติบโต ดังนั้นในการหมักเพื่อให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้เร็วและสร้างเซลลูโลสได้ดีที่สภาวะนิ่ง ภาชนะที่ใช้หมักต้องมีผิวหน้ากว้างเพื่อให้มีการซึมผ่านและถ่ายเทออกซิเจนได้ดี เชื้อจะลอยตัวอยู่บนผิวหน้าอาหารที่สภาวะนิ่ง และเมื่อเชื้อมีจำนวนและความหนาแน่นในระดับหนึ่งจะเริ่มสร้างวุ้นขึ้น (Schramm and Hestrin, 1954) นอกจากนี้ Masaoka *et al.* (1993) พบว่า การเลี้ยงเชื้อที่สภาพนิ่งในอาหารเหลว การสร้างเซลลูโลสขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของอาหารเหลวที่ใช้ ส่วนความลึกและปริมาณไม่มีผลต่อการสร้างความหนาของเซลลูโลส จึงได้มีการนำวิธีการเพิ่มออกซิเจนให้กับเชื้อ โดยวิธีการเขย่าในฟลาสก์และใช้วิธีการกวนด้วยใบพัดเพื่อเพิ่มออกซิเจนระหว่างการหมักในถังหมัก แต่พบว่าปริมาณของเซลลูโลสที่ผลิตได้กลับน้อยลงกว่าที่สภาวะนิ่ง (Schramm and Hestrin. 1954 ; Dudman. 1960 และ Yamanaka. 1989) ซึ่งต่อมา Kouda *et al.* (1997) พบว่าความเร็วรอบในการเขย่า การกวน ชนิดและสายพันธุ์มีผลต่อการสร้างเซลลูโลส นอกจากนี้ขนาดและชนิดของใบพัดที่ใช้กวนก็มีผลต่อการผลิตเช่นกัน ซึ่งผลของการศึกษาออกซิเจนและความดันของคาร์บอนไดออกไซด์ในการผลิตเซลลูโลสที่สภาวะการเจริญแบบมีการให้อากาศในถังหมักและมีใบพัดกวน โดยใช้วิธี Static gassing out method ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายเทออกซิเจนและอัตราการผลิตเซลลูโลสสูงขึ้น

Watanabe and Yamanaka (1995) ศึกษาผลของออกซิเจนที่มีต่อการสร้างเซลลูโลส พบว่าที่สภาวะนิ่งการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* เพื่อผลิตเซลลูโลสขณะที่มีการเจริญเติบโตและสร้างเซลลูโลสนั้นเชื้อมีการสร้างเจลเกิดขึ้นด้วย ซึ่งเจลลาตินมีผลต่อการสร้างเซลลูโลสเนื่องจากไปขัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวางการถ่ายเทออกซิเจนของเชื้อในอาหารเหลว ทำให้การถ่ายเทอากาศได้ไม่ดี จึงได้เพิ่มออกซิเจนลงไปในอาหาร จากการทดลองการให้ออกซิเจน 10 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจะไปทำให้การสร้างเซลลูโลสสูงกว่าสภาพออกซิเจนที่บรรยากาศปกติ

นอกจากการเติมอากาศลงในอาหารโดยตรงเพื่อเป็นการเพิ่มออกซิเจนให้กับเชื้อในระหว่างการหมักแล้ว ยังได้มีการเติม micro-particle ลงในอาหารหมักที่สภาวะเขย่า เช่น cellulose porous beads (CPBs) ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลสที่การหมักในสภาพกวน (agited condition) ได้ด้วย (Krusong *et al.* 1998)

2.8.5 ไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นสารที่มีความสำคัญในการสร้างเซลลูโลส อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของอาหารจะทำให้ *Acetobacter* ไม่สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ แหล่งไนโตรเจนได้แก่ สารพวกอินทรีย์และอนินทรีย์ เช่น เกลือแอมโมเนียม แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมฟอสเฟต อยู่ในรูปของไนเตรต เช่น ยูเรีย หรืออยู่ในรูปของสารอาหารที่สกัดจากธรรมชาติที่มีอยู่ใน Bacto-peptone, Bacto-soytone, Yeast-extract CSL (corn steep liquor) และ Bean-Condensate (Kouda *et al.* 2000)

จากการศึกษาของ Lapuz and Gallardo (1967) พบว่าการใช้ $NH_4H_2PO_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับ $(NH_4)_2SO_4$ และเปปโตน ในขณะที่การใช้ KNO_3 และ $NaNO_3$ ไม่พบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และไม่เกิดการสร้างเซลลูโลสเลย เนื่องจากพบว่าเป็นสารประกอบไนเตรตที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียชนิดนั้น

2.8.6 เอทานอลและกรดอะซิติก

Acetobacter เป็นกลุ่มเชื้อที่สามารถออกซิไดส์เอทานอลเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้ ดังนั้น *Acetobacter* sp. ทั้งหมดสามารถใช้ไวน์ได้ ซึ่งกระบวนการผลิตขึ้นอยู่กับระดับอัตราการหายใจของเชื้อ โดยส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่ต้องการอออกซิเจนเกือบทุกสายพันธุ์รวมทั้ง *A. aceti* สามารถเจริญในอาหารเหลวและลอยบนผิวอาหารเหลวได้โดยมีการสร้างเส้นใยสีขาวเกิดขึ้นที่สภาวะนิ่ง นอกจากนี้ *A. xylinum* สามารถสร้างเส้นใยและได้และจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียเซลลูโลสด้วย (Brow *et al. 1976*) แต่เชื้อจะไม่มีการสร้างเซลลูโลสเกิดขึ้นถ้าหากไม่มีกลูโคสในอาหาร นอกจากนี้ยังไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีเอทานอลเดี่ยว ๆ ถ้าหากไม่มีการเติมกรดอะซิติก เกลืออะซิเตตหรือกลูโคสลงไปด้วย

Toda *et al.* (1997) ศึกษาการสร้างเซลลูโลสที่สภาวะนิ่งของเชื้อ *A. xylinum* ในอาหาร glucose medium เมื่อมีการเติมกรดอะซิติกลงไปจะไปทำให้มีการสร้างเซลลูโลสเพิ่มขึ้นจากเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

4 เท่า และนอกจากนี้ถ้าเติมกรดอะซิติกลงไป 20 กรัม/ลิตร พบว่ามีการสร้างเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อ *A.pasteurianus* ที่สภาวะเดียวกัน

Naritomi *et al.* (1998) ศึกษาเอทานอลที่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสโดยใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ในการเจริญแบบต่อเนื่อง จากการศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR3001A ในอาหาร CSL-Fru medium ซึ่งมีน้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนและเติมเอทานอลลงไปในอาหาร 10 กรัม/ลิตรนั้น จะมีการสร้างเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 46 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปลี่ยนเอทานอลจาก 10 กรัม/ลิตร เป็น 15 กรัม/ลิตร หรือมากกว่า พบว่าอัตราการสร้างเซลลูโลสลดลง ซึ่งเอทานอลจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อและการใช้น้ำตาลในขบวนการสังเคราะห์ Bacterial Cellulose biosynthetic pathway

2.8.7 **สารอื่น ๆ**

นอกจากน้ำตาล ไนโตรเจนแล้ว ยังมีสารอื่น ๆ ที่เติมลงไปในอาหารในรูปแบบต่าง ๆ เช่น สารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของกรดอะมิโน วิตามิน กรดไขมัน นิวคลีอิค แอซิค 2,7,9 tricarboxy-1 Hpyrro[2,3,5]-quinoline-4, 5-dione, sulfite pulp น้ำทิ้งเยื่อกระดาษ

สารอินทรีย์ในรูปของเกลือต่าง ๆ เช่น ฟอสเฟต แมกนีเซียม แคลเซียม โคบอล โมลิปเดต ฮีมาไตท์ คีเลต

2.8.8 **การสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรียเซลลูโลส**

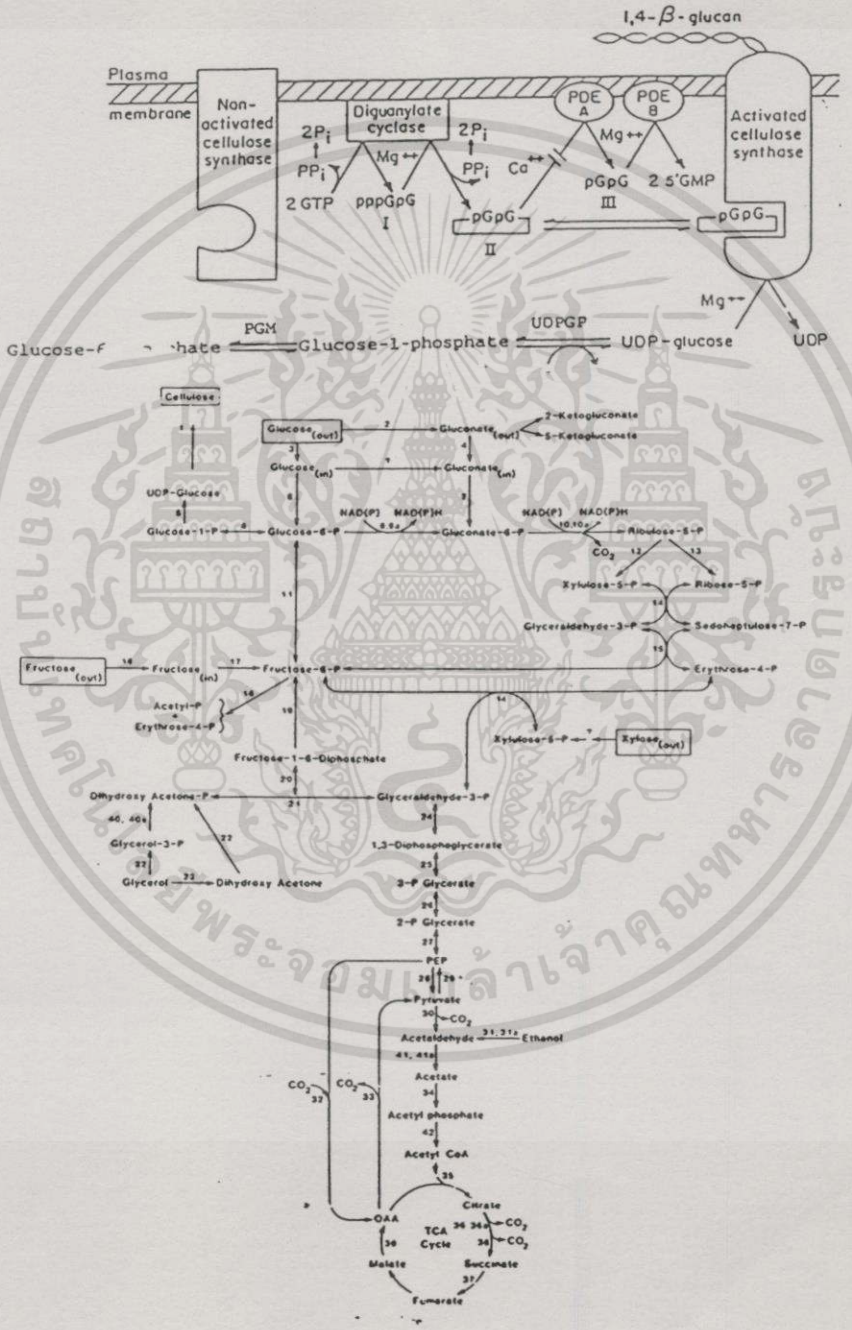
การศึกษาการสร้างเซลลูโลสจากแบคทีเรียเซลลูโลสนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า ใช้ *A. xylinum* เป็นตัวแทนของกลุ่มในการศึกษาการสังเคราะห์เซลลูโลส ทั้งด้านรูปร่างและด้านชีวเคมีภายในเซลล์ ซึ่งการศึกษาการสังเคราะห์เซลลูโลสส่วนใหญ่จะใช้กลูโคสเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นที่เข้าสู่ขบวนการสังเคราะห์ ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่ใช้การสังเคราะห์เซลลูโลสนอกจากกลูโคสแล้วยังสามารถใช้กลูโคเนตหรือฟรุกโตสในการสังเคราะห์เซลลูโลส โดยที่กลูโคสที่อยู่ภายในเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคเนต จากนั้นกลูโคสในส่วนที่เป็นกลูโคเนตจะถูกเปลี่ยนเป็น 2-ketogluconate และ 5- ketogluconate ซึ่งทั้งสองตัวนี้อาจถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งอาจเข้าร่วมหรือไม่เข้าร่วมในการสร้างเซลลูโลสก็ได้ ส่วนในไพรูเวท อะซิเตท และตัวกลางในวงจรซิเตรทเมื่อถูกออกซิไดส์ จนได้คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้นั้นไม่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างเซลลูโลสเลย

วัตถุดิบที่ใช้สร้างเซลลูโลสได้นั้นต้องสามารถเข้าสู่วงจรเพนโตสได้ด้วย ในขณะที่วัตถุดิบที่ให้คาร์บอนไดออกไซด์แต่ไม่ได้เข้าร่วมในการสังเคราะห์เซลลูโลสจะถือว่าเป็นส่วนที่ผ่านวงจรเพนโตสไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

49649

วงจรที่แสดงการสังเคราะห์เซลลูโลสนี้เป็นวงจรของเพนโตสที่เป็นส่วนหนึ่งในการเข้าสู่วงจรหลายวิถีที่มีการใช้กลูโคเนสต้องผ่านตัวกลางก่อน และจากวงจรที่แสดงยังได้แสดงอีกหลายวิธีที่ต้องผ่านการเปลี่ยนแปลงจากกลูโคสเป็นกลูโคเนทก่อน ซึ่งกลูโคเนทนี้สามารถเข้าสู่วงจรได้ 2 วิธี คือ การเข้าโดยตรง ซึ่งจะต้องใช้กลูโคไอเนส และทางอ้อมจะต้องผ่านเข้าทาง 5-ketogluconate และ 2- ketogluconate



ภาพที่ 2.5 แสดงวงจรการสร้างเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*

ที่มา : Ross *et. al.*(1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.9 ประโยชน์ของเซลลูโลสและการนำไปใช้

2.8.9.1 ด้านอาหาร

ปัจจุบันพบว่าการนำแผ่นวุ้นหรือเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในน้ำมะพร้าวมาทำเป็นส่วนประกอบของอาหารทั้งคาว หวาน และทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่น วุ้นในสลัด เจลลี นมเปรี้ยว ไอศกรีม วุ้นผสมน้ำผลไม้ และยังทำเป็นส่วนประกอบของอาหารคาวที่มีแคลอรี่ต่ำ ๆ เช่น kamaboko (boiled fish paste) แฮมเบอร์เกอร์ ไส้กรอก (Okiyama *et al.* 1992)

นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ (healthy food) โดยใช้ในการเพิ่มเยื่อใยและกากอาหาร ซึ่งเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก

2.8.9.2 ด้านการแพทย์และอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในทางการแพทย์ มีการใช้เซลลูโลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *A. xylinum* โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่งให้เชื้อสร้างเซลลูโลสเป็นแผ่นวุ้น และนำแผ่นวุ้นที่ได้มาใช้ในการรักษาบาดแผลที่ผิวหนังอันเนื่องมาจากการไหม้ในระยะที่ 2 และที่ 3 โดยใช้เป็นผ้าซับแผล หรือใช้พันแผลแทนผ้าพันแผล และยังใช้ในการตบแต่งเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ (Ring *et al.* 1986 ; Fontana *et al.* 1990 และ Fontana *et al.* 1991)

นอกจากนี้ Geyer *et al.*(1994) ได้นำเซลลูโลสมาพัฒนารูปแบบการผลิตให้มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกเพื่อใช้เป็นวัสดุแทนท่อเลือด ท่อน้ำเหลือง ท่อปัสสาวะและหลอดลม

2.8.9.3 กระดาษลำโพง

กระดาษที่ผลิตเพื่อใช้ทำลำโพงต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ ต้องให้คลื่นเสียงความเร็วสูง (high sonic velocity) และต้องลดคลื่นที่รบกวนได้ดี เพื่อให้ได้คุณภาพเสียงที่ชัดเจน วัสดุที่ใช้ในการผลิตกระดาษลำโพงมีหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป เช่น บางชนิดมีข้อเสียที่มีคุณสมบัติในการลดคลื่นรบกวนได้ไม่ดี ในขณะที่บางชนิดให้ความเร็วคลื่นได้ต่ำเกินไป เช่น เพียง 1,500 เมตร/นาทีเท่านั้น แต่จากการนำเซลลูโลสที่ผลิตได้จาก *A. xylinum* มาทำเป็นกระดาษลำโพง พบว่ามีข้อได้เปรียบหลายประการคือ ให้เสียงสูงที่ดี มีความเร็วสูงเท่ากับอลูมิเนียม และยังมีคุณสมบัติในการลดเสียงรบกวนได้ดีเท่ากับกระดาษ (Yamanaka. 1989)

2.8.10.4 ผลิตภัณฑ์กระดาษ

ฟีนอลเรซิน (phenol resin fiber) หรือเส้นใยคาร์บอน (carbon fiber) ซึ่งโดยปกติไม่สามารถทำเป็นแผ่นได้ แต่เมื่อนำเซลลูโลสที่ผลิตได้จาก *A. xylinum* ที่ผ่านการอบแห้งและบดเป็นผงแล้วมาผสมเป็นตัวเชื่อม (binder) จะทำให้เส้นใยเหล่านี้ขึ้นรูปเป็นแผ่นได้ ในการผลิตกระดาษคาร์บอน (Activated carbon fiber sheets) เพื่อใช้ในการดูดซับสารพิษ การเติมเซลลูโลสลงไปช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับสารให้ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.10.5 **สารให้ความหนืดและความคงตัว**

การนำเซลลูโลสจากการผลิตในอาหารเหลวของ *A. xylinum* ผสมกับพอลิเมอร์อื่น ๆ เช่น พอลีไวนิลแอลกอฮอลล์ เพื่อผลิตวัสดุที่มีความแข็งแรงและทนทาน ใช้เป็นสารให้ความหนืดและความคงตัวในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง

นอกจากนี้ยังได้นำเซลลูโลสที่ผลิตได้มาทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อให้ได้อนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose derivatives) เช่น ไฮดรอกซีเมทิลเซลลูโลส (hydroxymethylcellulose) คาร์บอนซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose) หรือเซลลูโลสอะซิเตต (celluose acetate) จึงทำให้การใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสของ *A. xylinum* เป็นไปอย่างกว้างขวางทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร ยา ผงซักฟอก กาว สิ่งทอ และกระดาษ เครื่องสำอาง เป็นต้น

2.9 วิธีการทำให้เซลลูโลสบริสุทธิ์

วิธีการผลิต Bacterial Cellulose produced ที่สร้างขึ้นมาแล้วจะมีเซลล์ของแบคทีเรียอื่น ๆ รวมอยู่ด้วย จึงต้องทำให้เซลลูโลสที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยนำวิธีการต่าง ๆ มาใช้ร่วมกัน

วิธีการต่าง ๆ ที่ทำให้ Bacterial Cellulose มีความบริสุทธิ์ ได้แก่ การล้าง การระเหยภายใต้ความดัน การล้างด้วยกรด ล้างด้วยด่าง ฟอกสีให้ขาวด้วยไฮโปคลอไรท์ หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ใช้เอนไซม์ไลซิง (lysing) ร่วมกับไลติค (lytic) หรือใช้ lauryl sulfate หรือ deoxycholate ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่ 200 องศาเซลเซียส

การล้างด้วยน้ำเป็นการเอาอาหารออกจากเซลลูโลส จากนั้น สกัดด้วย NaOH ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อเอาเซลล์ของ Bacterial Cellulose ออก ล้างด้วยน้ำให้หมด นำไปอบด้วยตู้อบแห้งแบบสุญญากาศ (vacuum oven) ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อทำให้เซลล์แห้ง

Kasaoka. (1993) ทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสจากการเลี้ยงด้วย *A. xylinum* ในอาหารเหลวจากนั้นนำเซลลูโลสที่ได้กรองด้วยตะแกรง ขนาด 45 ไมครอน จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำไปต้มด้วย 2% NaOH เป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนอีกหลาย ๆ ครั้ง จนหมดด่าง นำเซลลูโลสไปอบที่ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาหนึ่งคืน ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 การแยกเชื้อจุลินทรีย์

ขั้นตอนแรกของการคัดเลือกเชื้อ (screening) เพื่อใช้เชื้อในการหมัก ได้แก่ การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการ ออกจากแหล่งธรรมชาติ เช่น จากน้ำ อากาศ อาหาร ฯลฯ ด้วยอาหารแข็งหรืออาหารเหลวที่เหมาะสม เมื่อทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้มาแล้ว ปกติจะได้สายพันธุ์จำนวนมากมายซึ่งจำเป็นต้องนำมาผ่านการคัดเลือกเชื้อ เพื่อให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่มีคุณสมบัติ ตามที่ต้องการให้น้อยที่สุด ซึ่งในบางกรณีสามารถใช้วิธีการง่ายๆ ในการแยกเชื้อที่สร้างผลผลิตที่ต้องการได้ในขั้นตอนเดียว การคัดเลือกเชื้อจะเป็นส่วนที่ช่วยขจัดจุลินทรีย์ที่ไม่เกี่ยวข้องออกไปให้มากที่สุดเท่าที่จะมากได้ แต่ในบางกรณีอาจจะต้องใช้วิธีการสุ่มแยกเชื้อ (random isolation) ที่มีแนวโน้มในการสร้างผลผลิตที่ต้องการได้ออกมาก่อน เช่น ความสามารถในการเจริญสับสเตรตบางอย่าง หรือในอาหารที่มีสารประกอบบางอย่างอยู่ด้วย หรือความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะบางอย่างซึ่งแตกต่างไปจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ต้องการ แต่ในกรณีที่ไม่สามารถใช้คุณสมบัติหรือลักษณะเฉพาะที่ต้องการเป็นปัจจัยในการคัดเลือก (selective factor) ได้ก็อาจใช้วิธีแยกเชื้อจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่มที่มีแนวโน้มในการสร้างผลผลิตที่ต้องการได้ออกมาก่อน จากนั้นจึงนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างผลผลิตที่ต้องการต่อไป หลังจากที่แยกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างผลผลิตที่ต้องการได้แล้วจึงนำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิต โดยพิจารณาจากความสามารถในการสร้างผลผลิตควบคู่ไปกับความประหยัดของกระบวนที่ใช้

2.10.1 วิธีการแยกเชื้อโดยใช้คุณสมบัติที่ต้องการเป็นปัจจัยในการคัดเลือก

การคัดเลือกเบื้องต้น Enrichment liquid culture เป็นเทคนิคการแยกเชื้อโดยใช้อาหารเหลว ซึ่งเติมสารบางอย่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการ เช่น การใช้สับสเตรตที่จำเพาะบางอย่าง ซึ่งทำให้จุลินทรีย์ที่ต้องการเท่านั้นที่เจริญได้ หรือสารบางอย่างที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ การเติมสารปฏิชีวนะหรือสีย้อมบางชนิดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ต้องการได้ แต่ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่ต้องการ

อย่างไรก็ตามการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นในอาหารและอาจมีผลให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการเจริญขึ้นมาแทนที่จุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการได้ ดังนั้นการแยกเชื้อโดยใช้วิธีนี้จึงนิยมถ่ายเชื้อจาก enriched culture ลงไปในอาหารใหม่ ซึ่งมีส่วนประกอบเหมือนเดิมซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง โดยที่การถ่ายเชื้อแต่ละครั้งนั้นจะต้องเลือกระยะเวลาที่เหมาะสม ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์ต้องการเจริญอยู่เป็นจำนวนมาก กว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ จากนั้นจึงนำจาก enriched culture ปริมาณเพียงเล็กน้อยไปกระจาย (spread) บนอาหารแข็งเพื่อแยกเชื้อที่ต้องการออกมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์และเก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคัดเลือกขั้นที่สอง เป็นขั้นตอนของการคัดเลือกต่อการคัดเลือกเบื้องต้น การคัดเลือกขั้นนี้จะทำให้สามารถทราบรายละเอียดเพิ่มขึ้นว่าจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นนั้น มีคุณค่าเหมาะสมมากน้อยเพียงใด และช่วยกำจัดจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกไปให้มากที่สุดและเร็วที่สุด เพราะมิฉะนั้นจะต้องเสียค่าใช้จ่ายแพงมากและเสียเวลาด้วย

การพิจารณาในการคัดเลือกขั้นนี้มีดังนี้

2.10.1.1 คุณภาพ ปริมาณ และชนิดของผลผลิต โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีช่วยทำให้ทราบอย่างหยาบ ๆ ด้วยว่าผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ตรงกับความต้องการหรือไม่

2.10.1.2 การจัดจำแนกจุลินทรีย์ (identification) ทำให้ทราบว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดใหม่หรือไม่มีอันตรายต่อพืช สัตว์ คนหรือไม่ การจัดจำแนกควรคำนึงถึงชนิดหรือสปีชีส์ (species) จุลินทรีย์สิทธิบัตร (patent strain) จะต้องเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่พิสูจน์ได้ หรือสายพันธุ์ประดิษฐ์ หากเป็นสายพันธุ์ธรรมดาจะไม่ถือสิทธิบัตรกัน แต่อย่างไรก็ตามหากกระบวนการผลิตมีขั้นตอนใหม่หรือได้สารใหม่ที่ยังไม่เคยมีใครรายงานมาก่อนจะสามารถนำจดสิทธิบัตรได้ แม้ว่าจะเกิดจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ธรรมดาก็ตาม

2.10.1.3 สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อนั้น ๆ เช่น พีเอช ความต้องการอากาศ อุณหภูมิ ส่วนประกอบของอาหาร ฯลฯ ซึ่งจะมีความสำคัญกับความคงตัวของยีน การคัดเลือกขั้นนี้ควรจะเน้นตรวจสอบความไม่เสถียรภาพทางด้านพันธุกรรม (genetic instability) ของจุลินทรีย์ เพราะถ้าหากว่าลักษณะทางพันธุกรรมไม่เสถียรแล้วจุลินทรีย์นั้นจะไม่มีประโยชน์ในการนำไปศึกษาต่อ หรือนำไปใช้ประโยชน์

2.10.4 ควรหาข้อมูลเกี่ยวกับอาหาร (medium) อาหารบางชนิดที่มีความจำเป็นต่อการเจริญด้านเคมี การละลายในสารละลายอินทรีย์ต่าง ๆ

2.10.5 โครงสร้างเคมีของสารประกอบเป็นแบบเชิงเดี่ยว (simple) แบบเชิงซ้อน (complex) หรือโครงสร้างโมเลกุลใหญ่ ๆ (macromolecular structure) ถ้าหากไม่สามารถหาข้อมูลนี้ได้ควรมีข้อมูลอื่นที่เกี่ยวกับคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เช่น การดูดแสงอัลตราไวโอเลต การเรืองแสง (fluoresence) หรือคุณสมบัติทางเคมีที่ทำให้สามารถตรวจสอบสารประกอบนั้นได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการคาดคะเนเกี่ยวกับโครงสร้างของสารนั้น

ในระหว่างที่ทำการคัดเลือกขั้นที่สองนี้ ควรศึกษาอันตรายของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อพืช สัตว์ หรือมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าใช้สารนั้นเติมลงในอาหารโดยตรง

2.10.6 การคัดเลือกขั้นนี้ควรจะแสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมักว่ามีโครงสร้างทางเคมีหนึ่งแบบหรือมากกว่า มีคุณสมบัติการหมุนระนาบของแสงโพลาไรส์หรือมีบทบาทในเซลล์ (optical หรือ biologically active) เหมือนหรือแตกต่างกันสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบต่างชนิดกันอาจปะปนมาในการหมักอันเดียวกัน จึงทำให้เกิดผลผลิตหลักและผลผลิตรอง ในการแยกครั้งสุดท้าย หากได้ทั้งสองชนิดที่เป็นประโยชน์จะเป็นการดี

2.10.7 กรณีได้เชื้อใหม่หรือผลผลิตซึ่งเป็นชนิดใหม่ควรจะได้มีการคัดเลือกโดยตรวจสอบความเป็นพิษต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 จุลินทรีย์

A. xylinum DK ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 เคมีภัณฑ์

เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (ethanol)	กรมสรรพสามิต
กรดอะซิติก (acetic acid)	Merck Co.,Ltd.
ไซคลอเฮกไซไมด์ (cycloheximide)	Merck Co.,Ltd.
กลูโคส	Merck Co.,Ltd.
เปปโตน	Merck Co.,Ltd.
ได-โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-sodium hydrogen phosphate)	Merck Co.,Ltd.
กรดซิตริก (citric acid)	Merck Co.,Ltd.
วุ้น (agar)	SP.Scientific
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	Fluka
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)	Merck Co.,Ltd.

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

เครื่องหมุนเหวี่ยง	รุ่น RO-5	Gerhardt	GERMANY
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	SP-701	Suntex	TAIWAN
เครื่องชั่งตำแหน่งหยาบ	PE-3000	Mettler Toledo	SWITZERLAND
เครื่องชั่งตำแหน่งละเอียด	AB-204	Mettler Toledo	SWITZERLAND
หม้อนึ่งความดันไอ	SS320	Tomy Seiko	JAPAN
ตู้ถ่ายเชื้อ		ESSCO	THAILAND
เครื่องผสม	G-560	Vortex Gene-2	U.S.A.
เครื่องปั่นละเอียด	34BL99(8012)	Waring	U.S.A.
ตู้อบลมร้อน	UM-400	Memmert	GERMANY
ตู้อบไมโครเวฟ	NN-5656F	National	CHINA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถังหมัก	Micro-MFCS IFB RS-422		
		B.Braun	GERMANY
ตู้บ่มเชื้อ	BE400	Memmert	GERMANY
ตู้เย็น	MR-F20BDX-BG	Mitsubishi	THAILAND
กล้องจุลทรรศน์	CH30RF200	Olympus	JAPAN
เครื่องวัดความเข้มข้นของสารละลาย	UV-1600	Shimadzu	AUSTRALIA

3.4 เครื่องแก้ว - อุปกรณ์ ได้แก่

ฟลาสก์ บีกเกอร์ ปิเปตต์ กระบอกตวง หลอดทดลอง แท่งแก้วคน ขวดปรับปริมาตร ตะเกียงแอลกอฮอล์ ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) บีกเกอร์สแตนเลส กระบอกตวง จานเพาะเชื้อ ขวดอาหาร

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* DK ในอาหารต่าง ๆ

เตรียมสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามสูตรของ

- Hestrin and Schramm (1954)
- Alaban (1962)
- Forang *et al.* (1989)
- Oklyama *et al.* (1992)

ทำการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* DK ในอาหารสูตรต่าง ๆ เพื่อเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเซลลูโลส (ตามภาคผนวก ข) โดยจะทำการเตรียมหัวเชื้อ (starter inoculum) ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำมะพร้าวปริมาตร 90 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด ใช้ไปเปตดูดหัวเชื้อใส่ลงในอาหารตามสูตรต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารมีปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ทำการใส่หัวเชื้อในแต่ละฟลาสก์ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารที่ใช้หมัก จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลส และปริมาณ cell content (Krusong *et al.*, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 วิธีการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสที่ผลิตได้

นำเซลลูโลสที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง จากนั้นเติมด้วย NaOH 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 30 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ หลัง จากนั้นนำเซลลูโลสมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีกหลาย ๆ ครั้ง จนหมดความเป็นด่าง นำเซลลูโลสที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน (ประมาณ 12 ชั่วโมง) ด้วยตู้อบความร้อน ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง (น้ำหนักที่ได้/ ปริมาตรอาหารที่ใช้) เพื่อหาปริมาณของเซลลูโลสที่ผลิตได้ (Krusong *et al.*, 1995)

3.5.3 การคัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter* จากผลไม้เน่าเสีย

นำตัวอย่างผลไม้ในเขตร้อนที่มีลักษณะเน่าเสีย เช่น องุ่น สับปะรด เงาะ มาตัวอย่างละ 10 กรัม ใส่ลงไปในอาหารที่ได้จากการที่เชื้อเจริญได้มากที่สุดจากข้อ 3.5.1 ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารปริมาตร 900 มิลลิลิตร (เติมไซคลอเฮกไซไมด์ ร้อยละ 0.01 เอทานอล ร้อยละ 0.5 และกรดอะซิติก ร้อยละ 0.2 โดยปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเลือกเฉพาะฟลาสก์ที่มีการเจริญและสร้างวุ้นเซลลูโลสบนผิวหน้าอาหารเหลวเท่านั้น จากนั้นนำมาทำการตีปั่นด้วยเครื่องปั่นละเอียด ทำการเจือจางที่ระดับต่าง ๆ แล้วทำการ spread ลงบนอาหารแข็ง และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-7 วัน จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่มีลักษณะขุ่นขาว และนูนแข็ง โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลมเลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวใส่ลงหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนอื่น ๆ ต่อไป

3.5.4 ขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

ทำการคัดเลือกหลอดทดลองที่ใส่เชื้อลงไปที่บ่มเชื้อไว้อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3-5 วัน เลือกหลอดทดลองที่เชื้อมีการสร้างแผ่นเซลลูโลสเกิดขึ้น จากนั้นนำหลอดที่มีการสร้างเซลลูโลส มาทำการปั่นแล้ว streak ลงบนอาหารแข็ง (BSH medium) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3-5 วัน ทำการเลือกโคโลนีเดี่ยวที่ได้ streak ซ้ำลงบนอาหารแข็ง (BSH medium) ก่อนที่จะนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ steak ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารแข็ง slant ที่เตรียมจากน้ำมะพร้าว (Coconut Agar) เพื่อทำเป็นเชื้อเริ่มต้นในการศึกษาขั้นต่อไป

3.5.5 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้โดยศึกษาจากสภาวะต่าง ๆ ได้แก่

3.5.5.1 สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าที่สภาพในหลอดทดลอง

นำเชื้อเริ่มต้นจาก slant ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารจากข้อ 3.5.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่สภาวะนิ่งและสภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที เปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้ และคัดเลือกเชื้อที่มีการสร้างเส้นใยหรือแผ่นวุ้นในปริมาณมากเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3.5.5.2 การขยายการผลิตในระดับฟลาสก์

นำตัวอย่างที่ผ่านการคัดเลือกจากการศึกษาในระดับหลอดทดลองที่ให้ผลผลิตของเซลลูโลสในปริมาณมาก มาจำแนกชนิดของเชื้อและทดสอบด้านชีวเคมี เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อและทำการขยายการผลิต ศึกษาในระดับฟลาสก์ โดยนำไปเลี้ยงในอาหาร BSH medium ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้และคัดเลือกฟลาสก์ที่ให้ผลผลิตมากที่สุด เพื่อนำไปศึกษาที่ความเร็วรอบต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อไป

3.5.5.3 ศึกษาปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเซลลูโลส

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากการขยายการผลิตระดับฟลาสก์มาศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากสูตรอาหาร BSH medium (ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส 1 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อลงไป 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7 วัน ที่สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที เปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ได้ เพื่อคัดเลือกและนำไปศึกษาในระดับถังหมักต่อไป

3.5.5.4 การศึกษาในถังหมัก

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกว่าสามารถผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณมากที่สภาวะเขย่าในระดับฟลาสก์มาศึกษาการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสำหรับหมักปริมาตร 2500 มิลลิลิตร โดยนำความเร็วรอบที่เหมาะสมจากการเขย่าที่สภาวะเขย่า มาใช้ในระดับถังหมัก เพื่อศึกษาว่าเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสได้ดีและเหมาะสมหรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเซลลูโลสของ Bacterial Cellulose (BC)

การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* DK ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Bacterial Cellulose (Krusong *et al.*, 1998) เพื่อใช้ศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลส โดยทำการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ ได้แก่ Hestrin & Schramm (BSH medium) (1958) Alaban (1962) Forang (1989) และ Oklyama (1992) ซึ่งแต่ละชนิดมีปริมาตรน้ำหมักที่ใช้สำหรับการหมัก 500 มล ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหมัก นำไปเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้ ในระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสที่ได้ โดยคิดเป็นเซลลูโลสน้ำหนักแห้งที่ได้ (กรัมต่อปริมาตรของน้ำหมักที่ใช้) (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตจาก *A. xylinum* DK ในการเลี้ยงด้วยสูตรอาหารต่างๆ (ปริมาตรน้ำหมัก 500 มล.)

สูตรอาหาร	ปริมาณเซลลูโลสน้ำหนักแห้ง (กรัม)
Coconut water	0.8635
Hestrin & Schramm (BSH medium) (1958)	0.3854
Alaban (1962)	0.1878
Forang (1989)	0.1876
Oklyama (1992)	0.2272

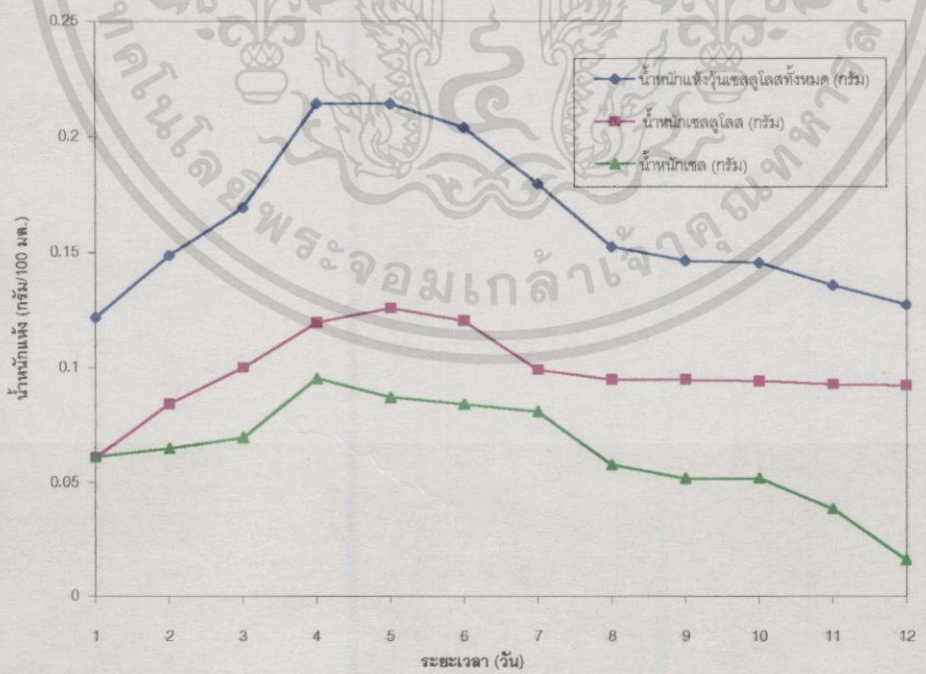
ผลการศึกษาพบว่าอาหารสูตร Hestrin & Schramm เป็นสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เนื่องจากเชื้อสามารถใช้อาหารในการสร้างเซลลูโลสและผลิตเซลลูโลสได้สูงสุดในจำนวนอาหารสังเคราะห์ทั้ง 4 สูตรด้วยกัน ซึ่งเป็นที่ทราบทั่วไปว่าเหมาะสมในการใช้ผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียเซลลูโลส (Hestrin and Schramm 1954) ส่วน Coconut water ให้ผลผลิตปริมาณเซลลูโลสที่สูงกว่าอาหารสูตร Hestrin & Schramm แต่เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งไม่สามารถควบคุมสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบอย่างแน่นอนใน Coconut

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

water (น้ำมะพร้าว) ได้ ดังนั้นในการศึกษาเบื้องต้นของการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลสจากธรรมชาติจึงเลือกใช้ Hestrin & Schramm (BSH medium) เพราะสามารถควบคุมปริมาณที่เป็นองค์ประกอบของอาหารในสูตรสังเคราะห์ และสอดคล้องกับรายงานของ Toyosaki *et al.* (1995) ที่พบว่าการผลิตเซลลูโลสของเชื้อนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อแล้วยังขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเซลลูโลสให้ได้ปริมาณมากอีกด้วย

4.2 การศึกษาระยะเวลาการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *A. xylinum* DK

ในการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญและสร้างเซลลูโลสที่เหมาะสมของ *A. xylinum* DK ในการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่งในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาตรอาหาร BSH meduim ที่ใช้ในการหมัก 100 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาการเจริญและการสร้างเซลลูโลสทั้งหมด 12 วัน (ภาพที่ 4.1) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าช่วงระยะเวลาวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 ของการหมัก เชื้อมีการเจริญเติบโตรวดเร็วและสามารถสร้างเซลลูโลสเป็นแผ่นวุ้นลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลวได้ปริมาณมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hestrin and Schramm (1954) และเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการที่จะนำไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น (starter) ในการทดลอง และหลังจากวันที่ 7 ของการหมัก พบว่าเชื้อมีการเจริญลดลง (ภาพที่ 4.1) จะเห็นได้จากปริมาณเซลล์ลดลงและเซลลูโลสที่สร้างขึ้นนั้นค่อนข้างคงที่ ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลลูโลสในการทดลองนี้ในช่วงการหมักเป็นระยะเวลา 7 วันของการทดลองต่อ ๆ ไป



ภาพที่ 4.1 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *A. xylinum* DK

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter* sp. จากธรรมชาติ

การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียเซลลูโลสจากตัวอย่างผลไม้ที่เน่าเสีย ได้แก่ สับปะรด องุ่น และเงาะ โดยเก็บตัวอย่างเหล่านี้มาทำการทดลองแยกโคโลนีต่างๆ จากอาหารเลี้ยงเชื้อ BSH meduim ที่มีการเติมสารยับยั้งการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ลงในอาหาร (สารดังกล่าวได้แก่ อะซิติก แอซิด 0.2 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ และไซโคเฮกไซไมด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) เพื่อเป็นการแยกเชื้อเบื้องต้นและแยกเชื้อกลุ่ม acetic acid bacteria ซึ่ง *Acetobacter* สามารถจัดเป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มนี้และจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียเซลลูโลสได้เช่นกันทั้งสองกลุ่ม สารเหล่านี้ยังใช้ในการยับยั้งการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นและเพื่อใช้สำหรับในการสร้างเส้นใยเซลลูโลสของแบคทีเรียเซลลูโลสอีกด้วย (Toyosaki *et al.*, 1995) ซึ่งจากการเจริญที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 7 วัน จะเกิดเส้นใยที่สร้างขึ้นและเป็นแผ่นวุ้นหนาลอยอยู่บนหน้าอาหารเหลว จากนั้นนำมาตีปั่นด้วยเครื่องปั่นละเอียดและนำมา spread ลงบนอาหารแข็ง BSH meduim บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3-5 วัน เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จำนวนเชื้อที่เลือกไว้ทั้งหมด 450 ชนิด ซึ่งในการเลือกโคโลนีจะเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีลักษณะกลมนูน สีขาว แข็ง เหนียว แต่เมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีโคโลนีขรุขระ หรือสร้างโคโลนีซ้อนกันโดยลักษณะดังกล่าวที่พบจะสอดคล้องกับรายงานของ Diaguila (1967) และ Toyosaki *et al.* (1995) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Acetobacter* ที่สามารถสร้างเส้นใยเซลลูโลสได้ จากนั้นนำโคโลนีที่มีลักษณะดังที่กล่าวมาแล้วนั้นใส่ลงในหลอดอาหารเหลว BSH meduim ปริมาตร 5 มล. โดย 1 โคโลนีต่อหลอด บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเลือกเฉพาะหลอดที่มีการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลส โดยจากเชื้อทั้ง 450 ชนิด พบว่ามีเพียง 106 ชนิด เท่านั้นที่การสร้างเซลลูโลสเกิดขึ้น จึงนำหลอดที่ได้มาตีปั่นอีกครั้งและทำการแยก Streak บนอาหารแข็งให้เป็นโคโลนีเดี่ยวอีกครั้งและนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว BSH meduim ปริมาตร 5 มล. โดย 1 โคโลนีต่อหลอด บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน อีกครั้ง ซึ่งตัวอย่างที่ได้จำนวน 106 โคโลนี โดยแยกเป็นโคโลนีที่ได้จาก องุ่น สับปะรด และเงาะที่เน่าเสียจำนวน 25 26 และ 65 โคโลนี (ตารางภาคผนวก ค) ตามลำดับ ซึ่งพบว่าชนิดของเชื้อและสามารถสร้างเซลลูโลสได้นั้นส่วนใหญ่จะได้จากแหล่งธรรมชาติที่ได้จากผลไม้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Toyosaki *et al.* (1995) ; Seto *et al.* (1997) จากนั้นจึงนำไปศึกษาการเจริญและสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลลูโลสของเชื้อต่างๆ เหล่านี้ โดยศึกษาที่สภาวะนิ่ง สภาวะเขย่า และสภาวะกวนในถังหมัก โดยทำการคัดเลือกชนิดที่สร้างเซลลูโลสปริมาณสูงสุดเพื่อใช้ในการผลิตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเซลลูโลสที่สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าในหลอดทดลองและระดับฟลาสก์

ระบบที่นำมาใช้แยกความสามารถในการคัดเลือกสำหรับการผลิตเซลลูโลสของแบคทีเรียเซลลูโลสนั้น ได้มีการพัฒนาเพิ่มขึ้นเป็นรูปแบบและวิธีการที่เป็นระบบในการศึกษาส่วนของการฟอร์มตัวเป็นเส้นใยเซลลูโลส โดย *Acetobacter* นั้นจากการศึกษาที่สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าในหลอดทดลองเพื่อคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้มากที่สุดและนำไปขยายขนาดของการผลิต จากการทดลองเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 106 ชนิด ในหลอดทดลองบรรจุอาหารเหลว BSH meduim ปริมาตร 5 มล. ปริมาตรเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหมัก บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน เลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสที่ได้ โดยคิดเป็นน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรน้ำหมักที่ใช้ (dw/v) จากการคัดเลือกพบว่าจำนวนเชื้อที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสปริมาณที่สูงสุดจำนวน 18 ชนิด จากตัวอย่างเชื้อทั้งหมด 106 ชนิด และเปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตได้ที่สภาวะเขย่าและสภาวะนิ่งในหลอดทดลองและในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาตรน้ำหมัก 100 มล. จากนั้นนำโคโลนีที่ได้จำนวน 18 ชนิด นำมาทดสอบทางด้านชีวเคมี เพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ในปริมาณสูงและอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียเซลลูโลส โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของ *Acetobacter* ซึ่งสามารถสร้างเซลลูโลสได้สูงสุดในกลุ่มของแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยกันเอง โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบของ *A.xylinum* DK และจัดจำแนกชนิดตาม Bergey's Manaul Determinative Bacteriology (1984 ; 1994) ซึ่งจากตัวอย่างเชื้อทั้งหมด 18 ชนิดนั้น สามารถแยกเป็นเชื้อในกลุ่มของ *Acetobacter* ได้เพียง 11 ชนิดเท่านั้น (ตารางที่ 4.2)

4.4.1 การศึกษาความสามารถในการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* ที่สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

การศึกษาสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าในหลอดทดลองเพื่อคัดเลือกตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลสที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้มากที่สุดและนำไปขยายขนาดของการทดลองในระดับฟลาสก์ จากการทดลองเชื้อทั้งหมด 106 ชนิด เลี้ยงในหลอดทดลองบรรจุอาหารปริมาตร 5 มล. ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหมัก เลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสที่ได้โดยคิดเป็นน้ำหนักแห้งต่อน้ำหมักที่ใช้ (ภาพที่ 4.2 และ 4.3) พบว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงและเป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มของ *Acetobacter* มีจำนวนเพียง 11 ชนิด จากเชื้อทั้งหมด 106 ชนิดนั้น เมื่อนำมาเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเซลลูโลสโดยคิดจากปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตได้แต่ละชนิด (ตารางที่ 4.2 และ 4.3) ส่วนการศึกการขยายการผลิตในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บรรจุอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบชีวเคมีในการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส

การทดสอบ/ รหัสเชื้อ	C4-6	C4-8	C7-3	C7-7	C7-10	C8-3	C8-5	C8-6	C8-9	C8-11	C8-12	C8-14	C8-16	C8-19	C8-20	A-11	B-13	B-39	*A. xylinum* DK
รูปร่าง	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	cocci	rod	rod	rod
catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OF-test	-/+	+/-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
MR	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferment-Glucose	+orA	+orA	+orA	+orA	+orA	+orA	+	+orA	+	+orA	+orA	+orA	+orA	+orA	+orA	+	-	+orA	+
การสร้างเซลลูโลส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 4.3 การสร้างเซลลูโลสจากอาหาร BSH medium ในหลอดทดลอง โดย *Acetobacter* sp.

รหัสเชื้อ (isolate code)	การเลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่ง		การเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเขย่า	
	น้ำหนักวุ้นเซลลูโลสแห้งทั้งหมด(กรัม)	น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง (กรัม)	น้ำหนักวุ้นเซลลูโลสแห้งทั้งหมด(กรัม)	น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง(กรัม)
A-11	0.0053 ± 0.0007^{b}	0.0020 ± 0.0002^{c}	0.0065 ± 0.0005^{de}	0.0032 ± 0.0001^{hi}
B-39	0.0049 ± 0.0005^{b}	0.0018 ± 0.0002^{c}	0.0073 ± 0.0005^{cde}	0.0035 ± 0.0001^{gh}
C7-3	0.0078 ± 0.0004^{a}	0.0038 ± 0.0004^{a}	0.0102 ± 0.0002^{b}	0.0047 ± 0.0001^{e}
C7-7	0.0050 ± 0.0004^{b}	0.0027 ± 0.0001^{b}	0.0078 ± 0.0007^{cde}	0.0038 ± 0.0002^{fg}
C7-10	0.0051 ± 0.0001^{b}	0.0027 ± 0.0001^{b}	0.0140 ± 0.0015^{a}	0.0096 ± 0.0001^{a}
C8-3	0.0056 ± 0.0001^{b}	0.0019 ± 0.0001^{c}	0.0102 ± 0.0006^{b}	0.0064 ± 0.0001^{c}
C8-5	0.0025 ± 0.0004^{c}	0.0004 ± 0.0001^{e}	0.0084 ± 0.0005^{bcd}	0.0063 ± 0.0001^{c}
C8-6	0.0057 ± 0.0010^{b}	0.0011 ± 0.0001^{d}	0.0089 ± 0.0006^{bc}	0.0082 ± 0.0002^{b}
C8-9	0.0044 ± 0.0004^{b}	0.0021 ± 0.0001^{c}	0.0073 ± 0.0005^{cde}	0.0030 ± 0.0002^{i}
C8-12	0.0053 ± 0.0005^{b}	0.0009 ± 0.0001^{de}	0.0064 ± 0.0005^{e}	0.0052 ± 0.0002^{d}
C8-16	0.0054 ± 0.0004^{b}	0.0021 ± 0.0002^{c}	0.0070 ± 0.0005^{cde}	0.0040 ± 0.0002^{f}

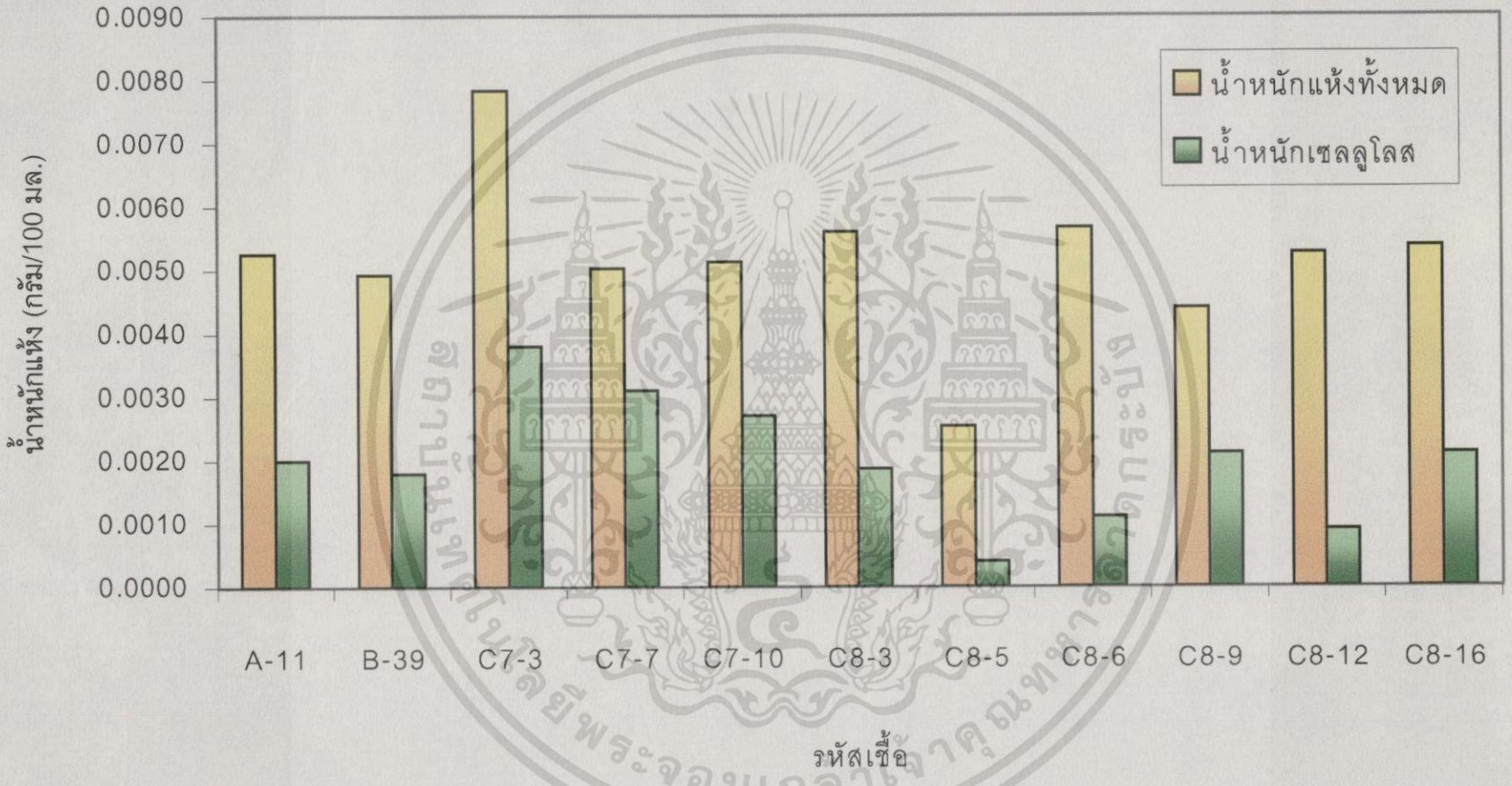
*ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % เมื่อเปรียบเทียบโดยแบบ LSD

A: ตัวอย่างองุ่นเน่าเสีย

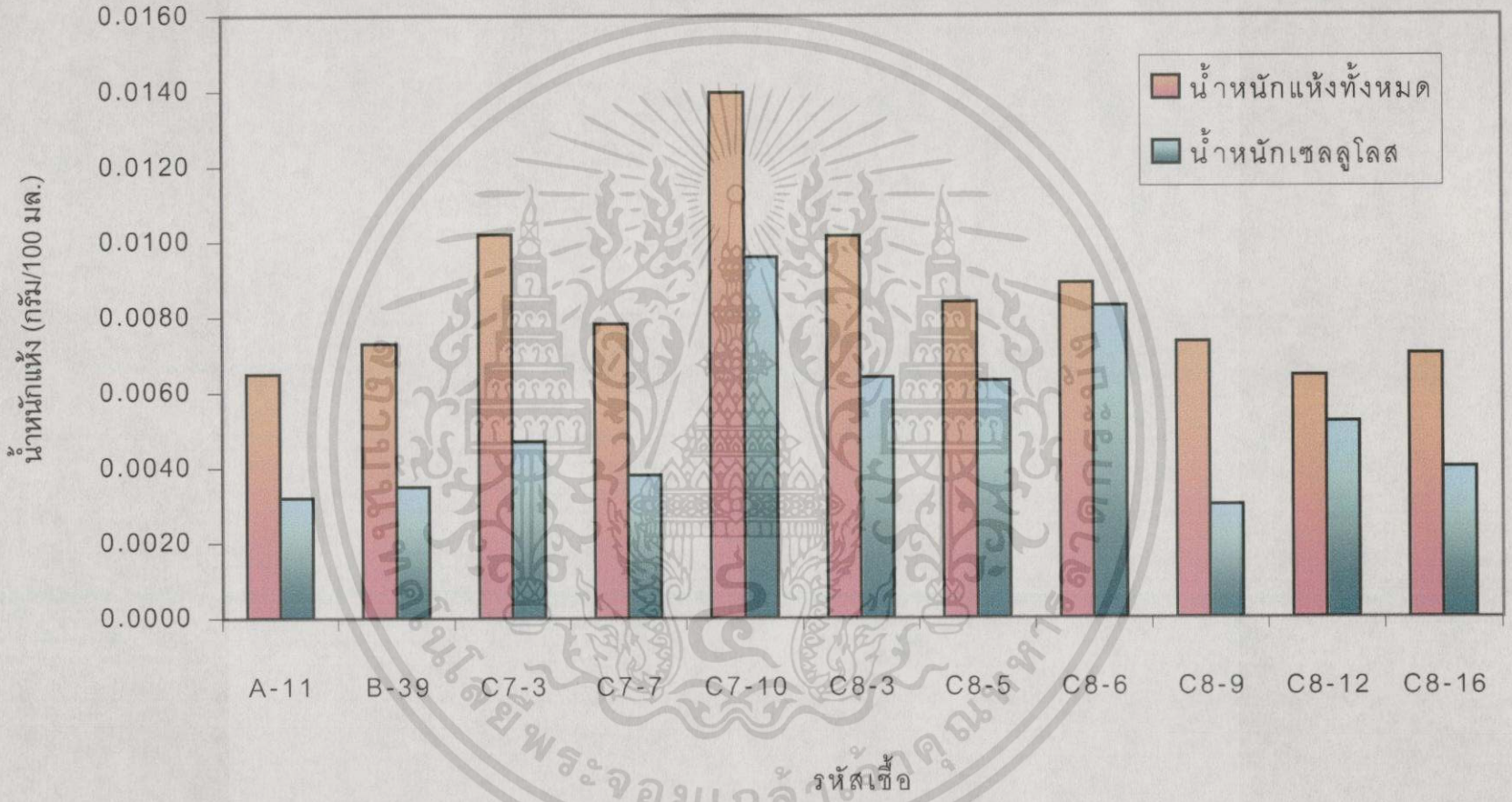
B: ตัวอย่างสับปะรดเน่าเสีย

C: ตัวอย่างเงาะเน่าเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ผลของการสร้างเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp. ที่สภาวะนิ่งในหลอดทดลอง



ภาพที่ 4.3 ผลของการสร้างเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp. ที่สภาวะเขย่าในหลอดทดลอง

100 มล. บ่มเชื้อไว้ระยะเวลา 7 วันเมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสที่ผลิตได้และเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้ (ภาพที่ 4.4) ซึ่งผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้นั้น พบว่าเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูโลสสูง 4 อันดับแรกและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสามารถเรียงลำดับน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสจากมากไปหาน้อยได้แก่ C7-10 C8-16 C8-3 C7-3 และปริมาณเซลลูโลสที่สร้างได้เรียงน้ำหนักแห้งจากมากไปน้อยดังนี้ 0.1453 ± 0.0256 0.1265 ± 0.0236 0.1042 ± 0.1042 และ 0.0878 ± 0.0878 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มล.ตามลำดับ

ส่วนการศึกษาการสร้างเซลลูโลสที่สภาวะเขย่าในฟลาสก์ของการหมักเพื่อสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* ทั้ง 11 ชนิด นั้น แต่ละชนิดเปรียบเทียบปริมาณการสร้างเช่นเดียวกับการหมักที่สภาวะนิ่ง โดยเลือกจากความสามารถในการสร้างเซลลูโลสของเชื้อจากปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตได้ พบว่าที่สภาวะเขย่าในฟลาสก์ขนาด 250 มล. อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ที่บรรจุน้ำหมัก 100 มล. บ่มระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสที่ได้ (ภาพที่ 4.5) โดยนำไปหาน้ำหนักแห้งและเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตได้ซึ่งสามารถเรียงน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตได้จากมากไปหาน้อย ได้แก่ C7-10 C8-3 C8-16 และ C7-3 เรียงลำดับน้ำหนักแห้งจากมากไปหาน้อย (ตารางที่ 4.4) ดังนี้ 0.1924 ± 0.0083 0.1735 ± 0.0157 0.1228 ± 0.0079 และ 0.1215 ± 0.0115 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มล. ตามลำดับ ซึ่ง C7-10 กับ C8-3 ปริมาณการสร้างเซลลูโลสไม่มีความแตกต่างทางสถิติ คือ 0.1924 ± 0.0083 กรัม กับ 0.1735 ± 0.0157 กรัม แต่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ C8-16 และ C7-3 ส่วน C8-16 และ C7-3 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกัน คือ 0.1228 ± 0.0079 กับ 0.1215 ± 0.0115 กรัม ตามลำดับ

จากการศึกษาเปรียบเทียบการสร้างเซลลูโลสทั้ง 2 สภาวะ พบว่ามีเชื้อบางชนิดที่สภาวะนิ่งให้ผลผลิตของเซลลูโลสเมื่อคิดเป็นน้ำหนักแห้งที่ผลิตได้น้อยกว่าที่สภาวะเขย่า (กรัมน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรน้ำหมักที่ใช้ 100 มล.) ได้แก่ C8-9 (สภาวะนิ่งผลิตได้ 0.0501 ± 0.0078 กรัม ส่วนที่สภาวะเขย่าผลิตได้ 0.0512 ± 0.0064 กรัม) C8-12 (สภาวะนิ่งผลิตได้ 0.04.3 ± 0.0114 กรัม ส่วนที่สภาวะเขย่าผลิตได้ 0.0330 ± 0.0085 กรัม) และ C8-16 (สภาวะนิ่งผลิตได้ 0.1265 ± 0.0236 กรัม ส่วนที่สภาวะเขย่าผลิตได้ 0.1228 ± 0.0079 กรัม) แต่เมื่อเปรียบเทียบชนิดของเชื้อทั้ง 11 ชนิด นำมาศึกษาที่สภาวะเขย่าและให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ได้แก่ A-11 (สภาวะนิ่งผลิตได้ 0.0259 ± 0.0032 กรัม ส่วนที่สภาวะเขย่าผลิตได้ 0.0333 ± 0.0067 กรัม) B-39 (สภาวะนิ่งผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การสร้างเซลลูโลสจากอาหาร BSH medium ในฟลาสก์ โดย *Acetobacter* sp.

รหัสเชื้อ	การเลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่ง		การเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเขย่า	
(isolate code)	น้ำหนักวุ้นเซลลูโลสแห้งทั้งหมด(กรัม)	น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง (กรัม)	น้ำหนักวุ้นเซลลูโลสแห้งทั้งหมด(กรัม)	น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง (กรัม)
A-11	0.0504 ± 0.0081^{ef}	0.0259 ± 0.0032^{ef}	0.0576 ± 0.0130^{g}	0.0333 ± 0.0067^{c}
B-39	0.0364 ± 0.0011^{f}	0.0170 ± 0.0015^{f}	0.0446 ± 0.0010^{g}	0.0293 ± 0.0019^{c}
C7-3	0.1277 ± 0.0073^{bc}	0.0878 ± 0.0126^{bc}	0.1573 ± 0.0068^{cd}	0.1215 ± 0.0115^{b}
C7-7	0.0633 ± 0.0186^{def}	0.0347 ± 0.0142^{ef}	0.0757 ± 0.0067^{efg}	0.0566 ± 0.0067^{c}
C7-10	0.1807 ± 0.0228^{a}	0.1453 ± 0.0256^{a}	0.2506 ± 0.0129^{a}	0.1924 ± 0.0083^{a}
C8-3	0.1755 ± 0.0222^{a}	0.1042 ± 0.0128^{b}	0.2025 ± 0.0183^{b}	0.1735 ± 0.0157^{a}
C8-5	0.0755 ± 0.0038^{def}	0.0312 ± 0.0036^{ef}	0.1164 ± 0.0146^{de}	0.0678 ± 0.0244^{c}
C8-6	0.1042 ± 0.0193^{cd}	0.0588 ± 0.0116^{cd}	0.0989 ± 0.0140^{ef}	0.0714 ± 0.0164^{c}
C8-9	0.1042 ± 0.0200^{cd}	0.0501 ± 0.0078^{cde}	0.0857 ± 0.0121^{efg}	0.0512 ± 0.0064^{c}
C8-12	$.0908 \pm 0.0172^{cde}$	0.0403 ± 0.0114^{de}	0.0586 ± 0.0233^{fg}	0.0330 ± 0.0085^{c}
C8-16	0.1636 ± 0.0161^{ab}	0.1265 ± 0.0236^{ab}	0.1755 ± 0.0176^{cd}	0.1228 ± 0.0079^{b}

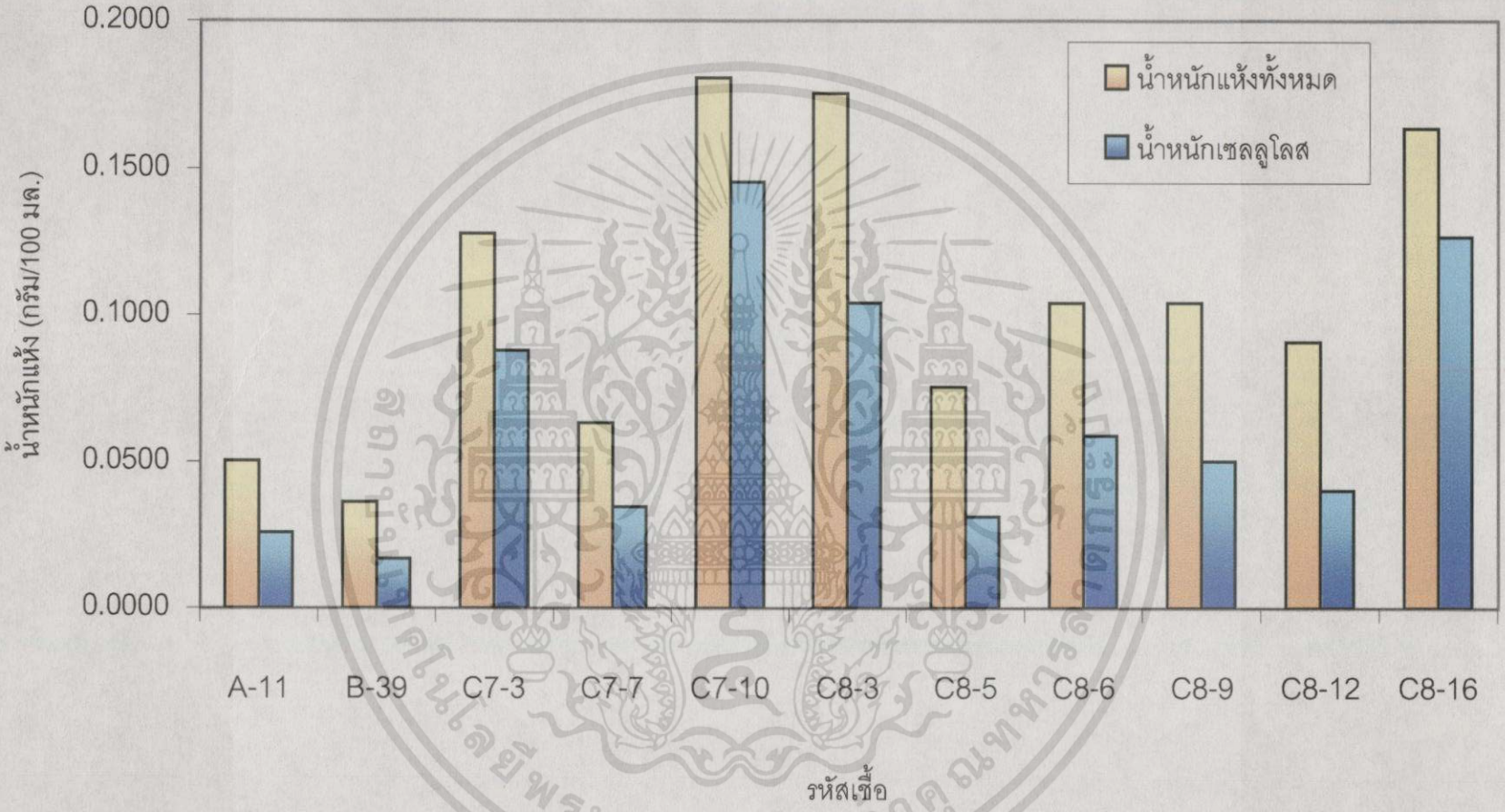
* ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % เมื่อเปรียบเทียบโดยแบบ LSD

A: ตัวอย่างองุ่นเน่าเสีย

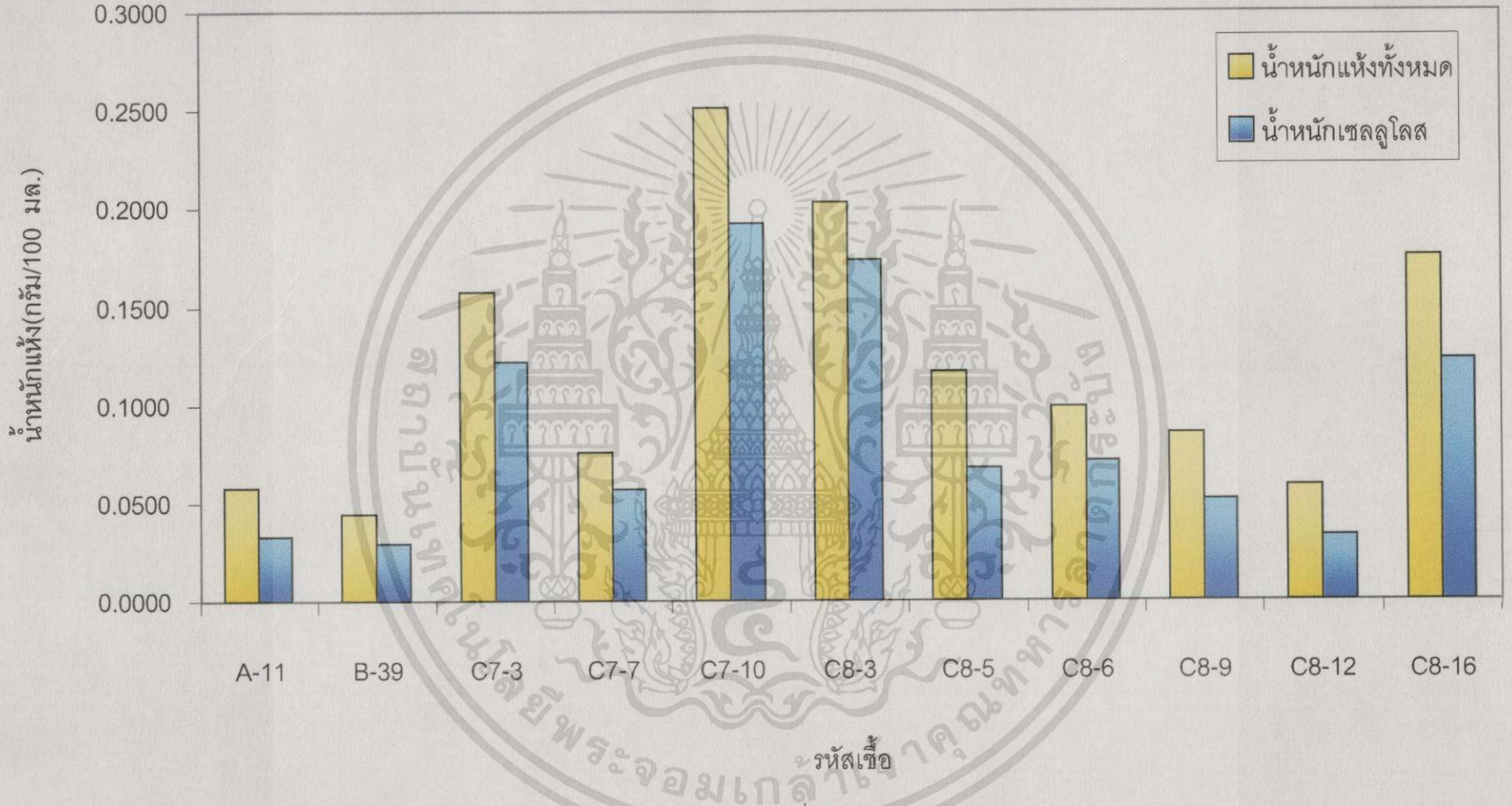
B: ตัวอย่างสับปะรดเน่าเสีย

C: ตัวอย่างเงาะเน่าเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 ผลของการสร้างเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp. ที่สภาวะนิ่งในฟลาสก์



ภาพที่ 4.5 ผลของการสร้างเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp. ที่สภาวะเขย่าในฟลาสก์

ได้ 0.0170 ± 0.0015 กรัม ส่วนที่สภาวะเขย่าผลิตได้ 0.0293 ± 0.0019 กรัม) C7-3 (สภาวะนิ่งผลิตได้ 0.0878 ± 0.0126 กรัม ส่วนที่สภาวะเขย่าผลิตได้ 0.1215 ± 0.0115 กรัม) C7-7 (สภาวะนิ่งผลิตได้ 0.0347 ± 0.0142 กรัม ส่วนที่สภาวะเขย่าผลิตได้ 0.0566 ± 0.0067 กรัม) C7-10 (สภาวะนิ่งผลิตได้ 0.1453 ± 0.0256 กรัม ส่วนที่สภาวะเขย่าผลิตได้ 0.1924 ± 0.0083 กรัม) C8-3 (สภาวะนิ่งผลิตได้ 0.1042 ± 0.0128 กรัม ส่วนที่สภาวะเขย่าผลิตได้ 0.1735 ± 0.0157 กรัม) C8-5 (สภาวะนิ่งผลิตได้ 0.0312 ± 0.0036 กรัม ส่วนที่สภาวะเขย่าผลิตได้ 0.0678 ± 0.0244 กรัม) และ C8-6 (สภาวะนิ่งผลิตได้ 0.0588 ± 0.0116 กรัม ส่วนที่สภาวะเขย่าผลิตได้ 0.0714 ± 0.0164กรัม) ซึ่งเชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณมากที่สภาวะเขย่าส่วนใหญ่แล้วจะได้จากตัวอย่างเงาะที่เน่าเสีย (ตารางที่ 4.3)

ทั้งนี้จากการศึกษาภายใต้สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างเซลลูโลสที่เกิดขึ้นในสภาวะทั้งสองนั้นแตกต่างกัน ซึ่งจากการสังเกตลักษณะการสร้างเซลลูโลสที่สภาวะนิ่งจะสร้างเซลลูโลสในลักษณะเป็นเส้นใยและรวมตัวกันเป็นแผ่นวุ้นหนาลอยอยู่เหนือผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อรับออกซิเจน ส่วนการศึกษาที่สภาวะเขย่าในฟลาสก์นั้น การสร้างเซลลูโลสจะมีลักษณะเป็นเม็ดๆ หรือเกาะกันเป็นก้อน ซึ่งขนาดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ จึงทำให้เซลลูโลสที่เกิดขึ้นนั้นจะแตกต่างกันด้วย และไม่มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Toyosaki *et al.* (1995) ; Sanchez *et al.* (1999)

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบชนิดของเชื้อที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้ดีทั้ง 2 สภาวะนั้น โดยเรียงลำดับปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสของเชื้อที่ผลิตได้จากมากไปน้อย ได้แก่ C7-10 C8-3 C8-16 และ C7-3 ซึ่งผลจากการทดลองจึงได้เลือกเชื้อทั้ง 4 ชนิดนี้ นำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสให้ได้ปริมาณมากต่อไป

4.5 การศึกษาสภาวะความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส

จากการศึกษาสภาวะความเร็วรอบในการเขย่าเพื่อผลิตเซลลูโลสที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเซลลูโลสนั้น จากการศึกษาความเร็วรอบต่างๆ ในการเขย่าได้แก่ 50 100 150 และ 200 รอบต่อนาที โดยจากการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. ที่ผ่านการคัดเลือกที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้สูงสุด จำนวน 4 ชนิด คือ C7-10 C8-3 C8-16 และ C7-3 ให้ผลผลิตในปริมาณมากที่สุดในกลุ่ม เรียงลำดับเซลลูโลสน้ำหนักแห้งที่ผลิตได้จากมากไปน้อยตามลำดับ เพื่อศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสม ซึ่งจากการทดลองพบว่าความเร็วรอบต่างๆ มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสโดยเปรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ความเร็วรอบต่างๆ ในการเขย่าฟลาสก์ที่มีผลต่อการสร้างวุ้นเซลลูโลสทั้งหมดจากอาหาร BSH-medium โดย *Acetobacter* sp.

เชื้อ (Isolate code)	ปริมาณน้ำหนักแห้งทั้งหมด(กรัม/ 100มล.) ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบ/นาที)			
	50	100	150	200
C7-3	0.0894 ± 0.0066	0.1573 ± 0.0068	0.0869 ± 0.0014	0.0987 ± 0.0134
C7-10	0.1080 ± 0.0035	0.2506 ± 0.0129	0.2072 ± 0.0064	0.1682 ± 0.0110
C8-3	0.0459 ± 0.0198	0.20.25 ± 0.0183	0.0627 ± 0.0105	0.0531 ± 0.0096
C8-16	0.1186 ± 0.0199	0.1755 ± 0.0176	0.1179 ± 0.0135	0.1595 ± 0.0114
ค่าเฉลี่ย	0.0905 ± 0.0104[c]	0.1965 ± 0.0123[a]	0.1187 ± 0.0170[b]	0.1198 ± 0.0150[b]

ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	เชื้อ (Isolate code) C7-3	C7-10	C8-3	C8-16
50	0.0894 ± 0.0066	0.1080 ± 0.0035	0.0459 ± 0.0198	0.1186 ± 0.0199
100	0.1573 ± 0.0068	0.2506 ± 0.00129	0.20.25 ± 0.0183	0.1755 ± 0.0176
150	0.0869 ± 0.0014	0.2072 ± 0.0064	0.0627 ± 0.0105	0.1179 ± 0.0135
200	0.0987 ± 0.0134	0.1682 ± 0.0110	0.0531 ± 0.0096	0.1595 ± 0.0114
ค่าเฉลี่ย	0.1080 ± 0.0094[c]	0.1835 ± 0.0163[a]	0.0911 ± 0.0205[c]	0.1429 ± 0.0102[b]

*ตัวอักษรเหมือนกันในแนวนอนหมายถึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบโดย LSD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

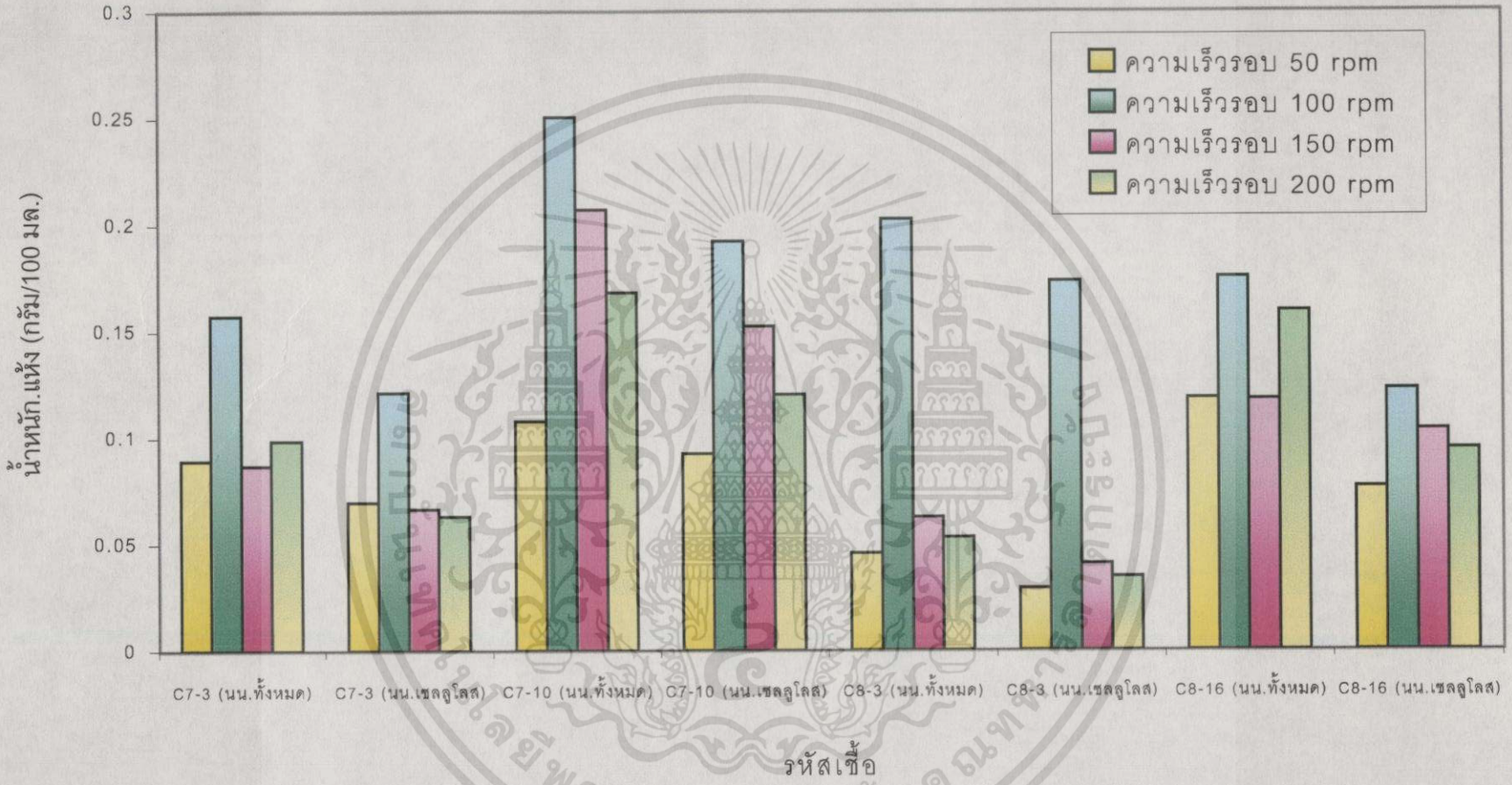
ตารางที่ 4.6 ความเร็วรอบต่างๆ ในการเขย่าฟลาสก์ที่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสทั้งหมดจากอาหาร BSH-medium โดย *Acetobacter* sp.

เชื้อ (Isolate code)	ปริมาณน้ำหนักเซลลูโลสแห้ง(กรัม/ 100มล.) ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบ/นาที)			
	50	100	150	200
C7-3	0.0699 ± 0.0099	0.1215 ± 0.0115	0.0667 ± 0.0009	0.0632 ± 0.0016
C7-10	0.0925 ± 0.0057	0.1924 ± 0.0083	0.1523 ± 0.0083	0.1203 ± 0.0027
C8-3	0.0291 ± 0.0116	0.1736 ± 0.0157	0.0408 ± 0.0180	0.0345 ± 0.0124
C8-16	0.0768 ± 0.0024	0.1228 ± 0.0079	0.1037 ± 0.0076	0.1037 ± 0.0076
ค่าเฉลี่ย	0.0671 ± 0.0079^{c}	0.1526 ± 0.0105^{a}	0.0908 ± 0.0314^{b}	0.0782 ± 0.0102^{b}

ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	เชื้อ (Isolate code)			
	C7-3	C7-10	C8-3	C8-16
50	0.0699 ± 0.0099	0.0925 ± 0.0057	0.0291 ± 0.0116	0.0768 ± 0.0024
100	0.1215 ± 0.0115	0.1924 ± 0.0083	0.1736 ± 0.0157	0.1228 ± 0.0079
150	0.0667 ± 0.0009	0.1523 ± 0.0083	0.0408 ± 0.0180	0.1037 ± 0.0076
200	0.0632 ± 0.0016	0.1203 ± 0.0027	0.0345 ± 0.0124	0.1037 ± 0.0076
ค่าเฉลี่ย	0.0883 ± 0.0079^{c}	0.1394 ± 0.0115^{a}	0.0695 ± 0.0192^{c}	0.0996 ± 0.0058^{b}

*ตัวอักษรเหมือนกันในแนวนอนหมายถึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบโดย LSD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ผลของความเร็วรอบของการเขย่าต่อปริมาณการสร้างเซลลูโลส

เทียบจากปริมาณการสร้างเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้ (ภาพที่ 4.6) จากปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสและความเร็วรอบที่ใช้ในการเขย่าที่ทำให้เชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสได้มากขึ้น จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เชื้อทั้ง 4 ชนิด สามารถเจริญและผลิตเซลลูโลสได้ดีที่ความเร็วรอบในการเขย่าฟลาสก์เพื่อผลิตเซลลูโลสที่ 100 รอบต่อนาที เป็นความเร็วรอบที่ให้ผลผลิตและสร้างเซลลูโลสได้ดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ 150 200 และ 50 รอบต่อนาทีตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ผลิตเซลลูโลสแห้งได้ 0.1526 ± 0.0105 กรัม/100 มล. รองลงมาได้แก่ ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งได้ 0.0980 ± 0.0314 กรัม/100 มล. ซึ่งไม่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเร็วที่ 200 รอบต่อนาที ที่เชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งได้ 0.0782 ± 0.0120 กรัม/100 มล. ส่วนความเร็วรอบที่ให้การผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งน้อยที่สุดในการเขย่าเพื่อผลิตเซลลูโลสคือ ความเร็วรอบที่ 50 รอบต่อนาที ที่เชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสได้ 0.0671 ± 0.0079 กรัม/100มล. ซึ่งจากการศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเขย่าเพื่อผลิตเซลลูโลสนี้คือความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ ณัฐพล (2542) ที่ศึกษาความเร็วรอบในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลลูโลส *A. xylinum* DK ที่ผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งได้ 2.14 กรัม/ลิตร และนำความเร็วรอบนี้นำไปศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป นอกจากนี้ชนิดของเชื้อ *Acetobacter* sp. ที่สภาวะเขย่าเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตและสร้างเซลลูโลสเรียงลำดับความสามารถในการสร้างเซลลูโลสจากมากไปหาน้อย ได้แก่ C7-10 C8-16 C7-3 และ C8-3 ตามลำดับ พบว่า C7-10 สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเชื้อ C8-16 C7-3 และ C8-3 แต่ C7-3 กับ C8-3 ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.6) ซึ่งสามารถผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งได้ดังนี้ คือ 0.1394 ± 0.0115 กรัม/100 มล. 0.0996 ± 0.0058 กรัม/100 มล. 0.0083 ± 0.0079 กรัม/100 มล. และ 0.0965 ± 0.0192กรัม/100 มล. ตามลำดับ

4.6 การศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในการสร้างเซลลูโลส

จากการศึกษาที่สภาวะต่าง ๆ ได้แก่ ชนิดของอาหาร สภาวะนิ่ง สภาวะเขย่า ความเร็วรอบที่เหมาะสมของการผลิตเซลลูโลส ซึ่งได้แก่ 100 รอบต่อนาทีนั้น จำนวนเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ดีเรียงลำดับการสร้างเซลลูโลสจากน้ำหนักแห้งเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้แก่ C7-10 C8-16 C7-3 และ C8-3 ตามลำดับ นั้น นำมาศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลลูโลสจากสูตรอาหาร BSH medium ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคสที่ใช้ศึกษาเป็นส่วนประกอบของสูตรอาหาร BSH medium ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ 1 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยจากการเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว 4 ชนิดที่สร้างเซลลูโลสสูงสุดได้แก่ C7-10 C8-16 C7-3 และ C8-3 ตามลำดับ นำมาเขย่าในฟลาสก์โดยใช้ความเร็วรอบที่ 100 รอบต่อนาที และศึกษาที่สภาวะนิ่งที่ใช้องค์ประกอบของน้ำตาลอาหารเช่นเดียวกัน ซึ่งจากการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร BSH medium เพื่อผลิตเซลลูโลสในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาตรอาหาร 100 มล. ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่มเชื้อ 7 วัน ผลของการสร้างเซลลูโลสน้ำหนักแห้งซึ่งทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสที่ได้และเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรน้ำหมักที่ใช้

จากการศึกษาที่สภาวะนิ่ง พบว่าปริมาณการใช้กลูโคสในการผลิตเซลลูโลสมีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.7) โดยความเข้มข้นของกลูโคสมีผลต่อปริมาณการสร้างเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.8) โดยพบว่าปริมาณกลูโคสที่ 2 เปอร์เซ็นต์ เชื้อสามารถใช้น้ำตาลในการผลิตเซลลูโลสได้สูงสุด รองลงมาได้แก่ 1 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มล.คือ 0.1159 $\pm$ 0.0016 กรัมต่อ100 มล. รองลงมาได้แก่ 0.0895 $\pm$ 0.0179 0.0594 $\pm$ 0.0099 และ 0.0475 $\pm$ 0.0067 กรัม/100 มล ตามลำดับ ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลที่ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบชนิดและความสามารถของเชื้อที่ใช้ผลิตเซลลูโลสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน โดยเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้สูงสุดคือ C7-10 คือสามารถผลิตเซลลูโลสได้ 0.1257 $\pm$ 0.0129 กรัม/100 มล. รองลงมาได้แก่ C7-3 C8-16และ C8-3 ซึ่งสามารถผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งดังนี้ 0.0777 $\pm$ 0.0073 0.0548 $\pm$ 0.0136 และ 0.0542 $\pm$0.0117กรัม/100 มล. ตามลำดับ โดย C8-16 และ C8-3 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งจากการทดลองสามารถสรุปปริมาณการสร้างเซลลูโลสที่สภาวะนิ่งจากการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและสามารถเรียงลำดับปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสที่เชื้อใช้จากมากไปหาน้อยได้แก่ น้ำตาลกลูโคส 2 1 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิต ได้แก่ C7-10

ส่วนปริมาณการใช้น้ำตาลในการผลิตเซลลูโลสที่สภาวะเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีนั้น จากการเปรียบเทียบปริมาณเปอร์เซ็นต์กลูโคสเช่นเดียวกับที่ศึกษาที่สภาวะนิ่ง พบว่าปริมาณการสร้างเซลลูโลสจากการใช้น้ำตาลกลูโคสเปอร์เซ็นต์ต่างๆ นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและสามารถเรียงลำดับปริมาณกลูโคสที่เชื้อใช้ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส 2 1 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเชื้อสามารถใช้น้ำตาลในการผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ปริมาณน้ำหนักแห้งทั้งหมดของการสร้างวุ้นเซลลูโลสจากความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ปริมาณต่างๆ ที่สภาวะนิ่งโดย *Acetobacter* sp.

เชื้อ (Isolate code)	ปริมาณน้ำหนักแห้งทั้งหมด (กรัม/ 100มล.)			
	ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส BSH medium (%)			
	1	5	10	กลุ่มควบคุม (2%)
C7-3	0.1334 ± 0.0163	0.0802 ± 0.0087	0.0781 ± 0.0081	0.1277 ± 0.0060
C7-10	0.2067 ± 0.0091	0.1019 ± 0.0047	0.1138 ± 0.0093	0.1807 ± 0.0186
C8-3	0.0526 ± 0.0126	0.0264 ± 0.0065	0.0324 ± 0.0041	0.1756 ± 0.0181
C8-16	0.1656 ± 0.0168	0.0554 ± 0.0041	0.0548 ± 0.0027	0.1636 ± 0.0131
ค่าเฉลี่ย	0.1396 ± 0.0186[b]	0.0659 ± 0.0091[c]	0.0697 ± 0.0097[c]	0.1619 ± 0.0100[a]
น้ำตาล (%)	เชื้อ (Isolate code)			
	C7-3	C7-10	C8-3	C8-16
1	0.1334 ± 0.0163	0.2067 ± 0.0091	0.0526 ± 0.0126	0.1656 ± 0.0168
5	0.0802 ± 0.0087	0.1019 ± 0.0047	0.0264 ± 0.0065	0.0554 ± 0.0041
10	0.0781 ± 0.0081	0.1138 ± 0.0093	0.0324 ± 0.0041	0.0548 ± 0.0027
กลุ่มควบคุม (2%)	0.1277 ± 0.0060	0.1807 ± 0.0186	0.1756 ± 0.0181	0.1636 ± 0.0131
ค่าเฉลี่ย	0.1048 ± 0.0095[b]	0.1508 ± 0.0146[a]	0.0718 ± 0.0193[c]	0.1098 ± 0.0175[c]

*ตัวอักษรเหมือนกันในแนวนอนหมายถึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบโดย LSD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

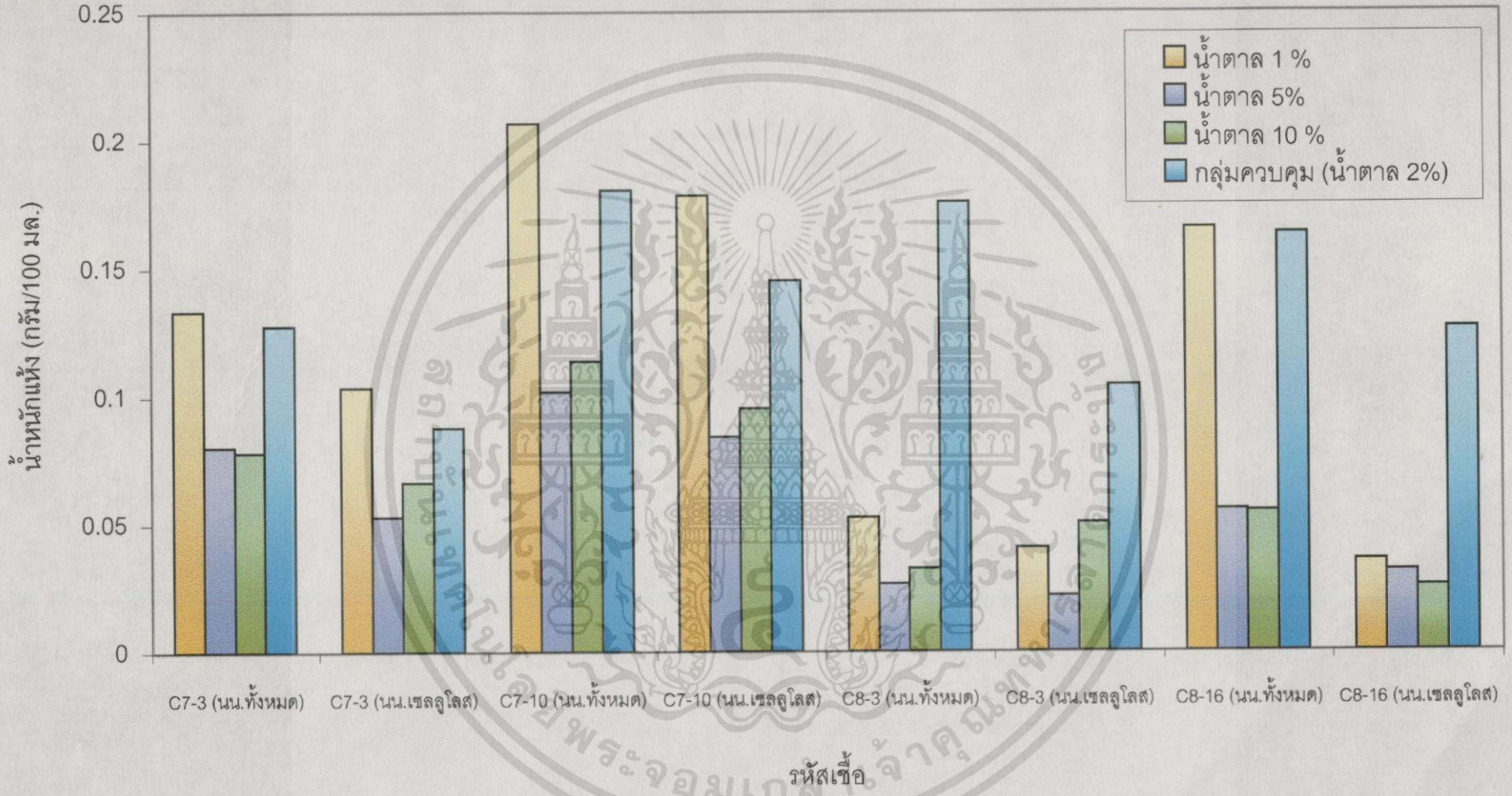
ตารางที่ 4.8 ปริมาณน้ำหนักเซลลูโลสแห้งของการสร้างเซลลูโลสจากความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ปริมาณต่างๆ ที่สภาวะนิ่งโดย *Acetobacter* sp.

เชื้อ (Isolate code)	ปริมาณน้ำหนักเซลลูโลสแห้ง (กรัม/ 100มล.)			
	ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส BSH medium (%)			
	1	5	10	กลุ่มควบคุม (2%)
C7-3	0.1035 ± 0.0088	0.0530 ± 0.0044	0.0665 ± 0.0084	0.0878 ± 0.0103
C7-10	0.1784 ± 0.0075	0.0841 ± 0.0038	0.0951 ± 0.0025	0.1453 ± 0.0209
C8-3	0.0405 ± 0.0106	0.0217 ± 0.0043	0.0503 ± 0.0224	0.1042 ± 0.0105
C8-16	0.0357 ± 0.0041	0.0315 ± 0.0058	0.0255 ± 0.0039	0.1265 ± 0.0193
ค่าเฉลี่ย	0.0895 ± 0.0179[b]	0.0475 ± 0.0067[c]	0.0594 ± 0.0099[c]	0.1159 ± 0.0106[a]

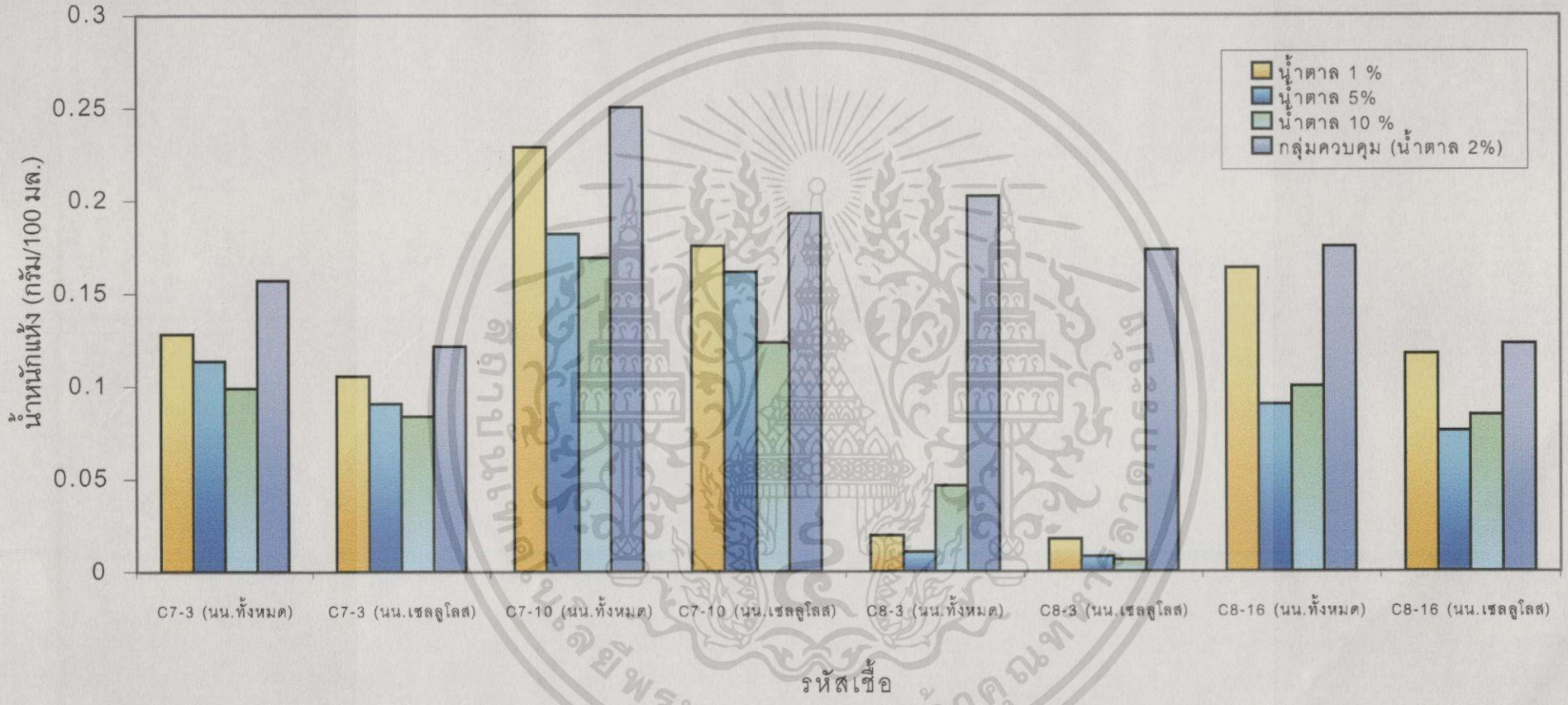
น้ำตาล (%)	เชื้อ (Isolate code)			
	C7-3	C7-10	C8-3	C8-16
1	0.1035 ± 0.0088	0.1784 ± 0.0075	0.0405 ± 0.0106	0.0357 ± 0.0041
5	0.0530 ± 0.0044	0.0841 ± 0.0038	0.0217 ± 0.0043	0.0315 ± 0.0058
10	0.0665 ± 0.0084	0.0951 ± 0.0025	0.0503 ± 0.0224	0.0255 ± 0.0039
กลุ่มควบคุม (2%)	0.0878 ± 0.0103	0.1453 ± 0.0209	0.1265 ± 0.0193	0.1265 ± 0.0193
ค่าเฉลี่ย	0.0777 ± 0.0073[b]	0.1257 ± 0.0129[a]	0.0542 ± 0.0117[c]	0.0548 ± 0.0136[c]

*ตัวอักษรเหมือนกันในแนวนอนหมายถึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบโดย LSD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ผลของปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่อการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp.ที่สภาวะนิ่งในฟลาสก์



ภาพที่ 4.8 ผลของปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่อการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp.ที่สภาวะเขย่าในฟลาสก์

ตารางที่ 4.9 ปริมาณน้ำหนักแห้งทั้งหมดของการสร้างวุ้นเซลลูโลสจากความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ปริมาณต่างๆ ที่สภาวะเขย่า 100 รอบ/นาที โดย *Acetobacter* sp.

เชื้อ (Isolate code)	ปริมาณน้ำหนักแห้งทั้งหมด (กรัม/ 100มล.)			
	ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส BSH medium (%)			
	1	5	10	กลุ่มควบคุม (2%)
C7-3	0.1284 ± 0.0070	0.1138 ± 0.0047	0.0990 ± 0.0053	0.1573 ± 0.0055
C7-10	0.2291 ± 0.0224	0.1825 ± 0.0104	0.1695 ± 0.0145	0.2506 ± 0.0105
C8-3	0.0195 ± 0.0004	0.0107 ± 0.0002	0.0465 ± 0.0260	0.2025 ± 0.0149
C8-16	0.1639 ± 0.0269	0.0903 ± 0.0228	0.0999 ± 0.0119	0.1755 ± 0.0143
ค่าเฉลี่ย	0.1352 ± 0.0247[b]	0.0993 ± 0.0196[c]	0.1037 ± 0.0157[c]	0.1965 ± 0.0123[a]
น้ำตาล	เชื้อ (Isolate code)			
	C7-3	C7-10	C8-3	C8-16
1	0.1284 ± 0.0070	0.2291 ± 0.0224	0.0195 ± 0.0004	0.1639 ± 0.0269
5	0.1138 ± 0.0047	0.1825 ± 0.0104	0.0107 ± 0.0002	0.0903 ± 0.0228
10	0.0990 ± 0.0053	0.1695 ± 0.0145	0.0465 ± 0.0260	0.0999 ± 0.0119
กลุ่มควบคุม (2%)	0.1573 ± 0.0055	0.2506 ± 0.0105	0.2025 ± 0.0149	0.1755 ± 0.0143
ค่าเฉลี่ย	0.1005 ± 0.0053[b]	0.1637 ± 0.0083[a]	0.0513 ± 0.0217[c]	0.1002 ± 0.0103[b]

*ตัวอักษรเหมือนกันในแนวนอนหมายถึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบโดย LSD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ปริมาณน้ำหนักเซลลูโลสแห้งของการสร้างเซลลูโลสจากความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ปริมาณต่างๆ ที่สภาวะเขย่า 100 รอบ/นาที โดย *Acetobacter* sp.

เชื้อ (Isolate code)	ปริมาณน้ำหนักเซลลูโลสแห้ง (กรัม/ 100มล.) ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส BSH medium (%)			
	1	5	10	กลุ่มควบคุม (2%)
C7-3	0.1058 ± 0.0026	0.0908 ± 0.0043	0.0840 ± 0.0034	0.1215 ± 0.0094
C7-10	0.1760 ± 0.0062	0.1619 ± 0.0041	0.1236 ± 0.0061	0.1933 ± 0.0068
C8-3	0.0174 ± 0.0017	0.0080 ± 0.0090	0.0063 ± 0.0004	0.1735 ± 0.0128
C8-16	0.1175 ± 0.0251	0.0757 ± 0.0159	0.0848 ± 0.0089	0.1228 ± 0.0065
ค่าเฉลี่ย	0.1042 ± 0.0184[b]	0.0841 ± 0.0171[c]	0.0746 ± 0.0131[c]	0.1528 ± 0.0106[a]

น้ำตาล (%)	เชื้อ (Isolate code) C7-3	C7-10	C8-3	C8-16
1	0.1058 ± 0.0026	0.1760 ± 0.0062	0.0174 ± 0.0017	0.1175 ± 0.0251
5	0.0908 ± 0.0043	0.1619 ± 0.0041	0.0080 ± 0.0090	0.0757 ± 0.0159
10	0.0840 ± 0.0034	0.1236 ± 0.0061	0.0063 ± 0.0004	0.0848 ± 0.0089
กลุ่มควบคุม (2%)	0.1215 ± 0.0094	0.1933 ± 0.0068	0.1735 ± 0.0128	0.1228 ± 0.0065
ค่าเฉลี่ย	0.1005 ± 0.0053[b]	0.1637 ± 0.0083[a]	0.0513 ± 0.0217[c]	0.1002 ± 0.0103[b]

*ตัวอักษรเหมือนกันในแนวนอนหมายถึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบโดย LSD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตรน้ำหมักที่ใช้ 100 มล. เรียงลำดับน้ำหนักแห้งจากมากไปหาน้อย ดังนี้ คือ (ตารางที่ 4.10) 0.1528 ± 0.0106 0.1042 ± 0.0184 0.0841 ± 0.0171 และ 0.0746 ± 0.0131 กรัม/100 มล. ตามลำดับ และเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ดีเรียงจากความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดี ดังนี้ คือ C7-10 C7-3 C8-16 และ C8-3 (ภาพที่ 4.8) ซึ่งเชื้อสามารถใช้น้ำตาลในการผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรน้ำหมักที่ใช้ 100 มล. เรียงลำดับน้ำหนักแห้งจากมากไปหาน้อย ดังนี้ คือ 0.1637 ± 0.0083 0.1005 ± 0.0053 0.1002 ± 0.0103 และ 0.0513 ± 0.0217 กรัม/100 มล. ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการเพิ่มปริมาณน้ำตาลให้เข้มข้นขึ้นที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารทำให้ความสามารถของเชื้อในการสร้างเซลลูโลสลดลง ดังนั้น เชื้อที่เหมาะสมกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อสร้างเซลลูโลสคือ C7-10 และน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมที่สุดได้แก่น้ำตาลกลูโคสที่เป็นองค์ประกอบ 2 เปอร์เซ็นต์ของสูตรอาหาร BSH medium (ตารางที่ 4.10)

4.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสในถังหมัก

จากการศึกษาเบื้องต้นที่นำมาสู่การขยายการผลิตในระดับถังหมัก ได้แก่การศึกษาที่สภาวะนิ่ง สภาวะเขย่า ชนิดของเชื้อ ความเร็วรอบ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการสร้างเซลลูโลสนั้น เมื่อนำเชื้อ *Acetobacter* sp. รหัส C7-10 มาศึกษาที่สภาวะในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยการใช้ Coconut water เป็นน้ำหมักในการผลิตเซลลูโลสและมีการเติมน้ำตาลกลูโคสลงไป 1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำหมักที่ใช้ 2500 มล. ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีการกวนด้วยใบพัดขนาดความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เพื่อเป็นการให้อากาศแก่เชื้อแทนการเขย่านั้น ระยะการหมัก 7 วัน จากการทดลองพบว่าเชื้อมีการสร้างเซลลูโลสได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังตารางที่ 4.11 ดังนี้

ตารางที่ 4.11 ปริมาณการผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp. ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรน้ำหมัก 2500 มล.

เชื้อ (Isolate code)	ปริมาณเซลลูโลสน้ำหนักแห้ง (กรัม/ ลิตร)	
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
C7-10	0.2040	0.1560
	เฉลี่ย = 0.1800	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางปริมาณเซลลูโลสน้ำหนักแห้งเฉลี่ยที่ได้เท่ากับ 0.1800 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเซลลูโลสที่ผลิตได้ 0.018 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับที่สภาวะเขย่า 100 รอบต่อนาที ของการหมักด้วย Coconut water (น้ำมะพร้าว) ของเชื้อ *A. xylinum* DK ที่ใช้ปริมาตรน้ำหมัก 500 มล. ที่สามารถผลิตเซลลูโลสจากสภาวะเขย่า 0.8635 กรัม (ตารางที่ 4.1) คิดเป็นเซลลูโลสน้ำหนักแห้งที่ผลิตได้ 1.7270 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบในอัตราส่วนที่เท่าๆ กันของปริมาตรน้ำหมักที่ใช้และความเร็วรอบที่ใช้ 100 รอบต่อนาทีนั้น พบว่ามีความแตกต่างกันมาก แต่จากการเปรียบเทียบกับปริมาณการสร้างเซลลูโลสจากการหมักด้วยอาหาร BSH medium จากสภาวะเขย่าที่ 100 รอบต่อนาทีในปริมาณที่เท่ากัน พบว่าผลิตเซลลูโลสได้ 1.9250 กรัมต่อลิตร ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (ตารางที่ 4.4) ซึ่งจากการทดลองพบว่าที่สภาวะการกวนในถังหมักยังเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* sp. รหัส C7-10 ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Yoshino *et al.* (1996) ที่พบปัญหาการผลิตเซลลูโลสในสภาพกวนในถังหมัก ไม่ประสบผลสำเร็จในการผลิตเซลลูโลสเท่าที่ควร เนื่องจากเชื้อมีการเจริญไม่คงที่และอาจถูกยั้บยั้งจากการกวนด้วยใบพัดในระหว่างการเจริญและการผลิตเซลลูโลสในถังหมัก ถึงแม้ว่ามีบางสายพันธุ์เท่านั้นที่เจริญได้ดีในสภาวะกวน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะพบว่าที่สภาวะนิ่งและเขย่าจะให้ผลผลิตเซลลูโลสได้ดีกว่าสภาวะกวนด้วยใบพัดในถังหมัก แต่มีข้อเสียคือใช้พื้นที่ในการผลิตและสิ้นเปลืองแรงงานมาก ดังนั้นจึงควรหาวิธีการอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป ซึ่งวิธีการผลิตเซลลูโลสขึ้นอยู่กับปัจจัยในการผลิต คือ สภาวะที่ใช้เลี้ยง ชนิดของอาหาร และชนิดของเชื้อที่ใช้ในการผลิต ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อในกลุ่มของ *Acetobacter* sp. มีความไม่คงที่ในการผลิตและมีความหลากหลายของตัวเชื้อเอง จึงทำให้การผลิตเซลลูโลสไม่คงที่ ดังนั้นการเลือกปัจจัยต่างๆ จึงมีความสำคัญต่อการผลิตเซลลูโลสเป็นอย่างมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเพื่อคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ในปริมาณมาก และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเซลลูโลสโดยเฉพาะเชื้อในกลุ่มของ *Acetobacter* sp. นั้น ปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญและสร้างเซลลูโลสมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง และเป็นพื้นฐานในการขยายขนาดการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตเซลลูโลสในปริมาณมาก ซึ่งจากการศึกษาเชื้อกลุ่ม *Acetobacter* sp. ที่คัดเลือกจากแหล่งธรรมชาติซึ่งได้จากผลไม้ที่เน่าเสียนั้น สามารถสรุปได้ ดังนี้

5.1 อาหาร

จากการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเจริญและผลิตเซลลูโลส โดย *A. xylinum* DK จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ 4 สูตร ได้แก่ Hestrin and Schramm Alaban Forang และ Oklyama นั้นพบว่าอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส ได้แก่ Hestrin and Schramm ซึ่งเชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรน้ำหมัก 500 มล. จำนวน 0.3854 กรัม

5.2 ระยะเวลาในการเจริญและสร้างเซลลูโลส

การศึกษาระยะการเจริญและการสร้างเซลลูโลสที่เหมาะสมของเชื้อ *A. xylinum* DK เพื่อใช้ในการหมักที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เพื่อสร้างเซลลูโลสที่เหมาะสมที่สุดคือ 3-7 วัน

5.3 การคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียเซลลูโลส

คัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลสที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ในปริมาณที่สูงและอยู่ในกลุ่มของ *Acetobacter* sp.นั้น ที่มีลักษณะเฉพาะของโคโลนีบนอาหารแข็ง ลักษณะของโคโลนีจะมีสีขาว กลม นูน และ แข็ง ถ้าอายุมากขึ้นจะมีสีเข้มขึ้น และบางสายพันธุ์จะสร้างโคโลนีซ้อนกัน ซึ่งจะหาตัวอย่างเชื้อได้จากตัวอย่างผลไม้เน่าเสีย ได้แก่ สับปะรด องุ่น และ เงาะ จำนวนตัวอย่าง 405 โคโลนี สามารถแยกเป็นเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้จำนวน 106 ชนิด จากสับปะรด องุ่น และ เงาะ จำนวน 25 26 และ 65 โคโลนี ตามลำดับ สามารถสร้างเซลลูโลสได้สูง จำนวน 18 ชนิด และสามารถจัดจำแนกเป็นเชื้ออยู่ในกลุ่มของ *Acetobacter* sp. เพียง 11 ชนิดเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส

ในการศึกษาสภาวะที่แตกต่างกันของเชื้อ จะทำให้การสร้างเซลลูโลสที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันด้วย

5.4.1 การศึกษาสภาวะนิ่งของเชื้อ *Acetobacter* sp. จำนวน 11 ชนิด พบว่ามีเพียง 4 ชนิด ที่ให้ปริมาณการสร้างเซลลูโลสน้ำหนักแห้งสูงสุด ได้แก่ C7-10 C8-16 C8-3 และ C7-3 ซึ่งผลิตได้ 0.1453 ± 0.0256 0.1265 ± 0.0236 0.1042 ± 0.0128 และ 0.0878 ± 0.0126 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มล. ตามลำดับ

5.4.2 การศึกษาที่สภาวะของเชื้อ *Acetobacter* sp. จำนวน 11 ชนิดพบว่ามีเพียง 4 ชนิด ที่ให้ปริมาณการสร้างเซลลูโลสน้ำหนักแห้งสูงสุด ได้แก่ C7-10 C8-16 C7-3 และ C8-3 ซึ่งผลิตได้ 0.1924 ±0.0083 0.1735 ± 0.0157 0.1128 ± 0.0079 และ 0.1215 ± 0.0115 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มล. ตามลำดับ

5.5 การศึกษาความเร็วรอบและชนิดของเชื้อที่เหมาะสมกับการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* sp.

การศึกษาความเร็วรอบที่ 50 100 150 และ 200 รอบต่อนาทีนั้น เพื่อหาความเร็วรอบที่เหมาะสมกับการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter* sp. ที่คัดเลือกได้เชื้อที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสน้ำหนักแห้งสูงสุดที่สภาวะเขย่านั้น พบว่าความเร็วรอบที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเซลลูโลส ได้แก่ ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และเมื่อเพิ่มความเร็วให้มีความเร็วมากขึ้นพบว่าเชื้อมีการสร้างเซลลูโลสลดลง และเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ดีที่สุด คือ C7-10

5.6 การศึกษาภายใต้สภาวะถังหมัก

จากการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. ที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงที่สุด คือ C7-10 และนำมาศึกษาในถังหมัก 5 ลิตรที่มีปริมาตรน้ำหมักโดยใช้ Coconut water ปริมาตร 2500 มล. พบว่าปริมาณการสร้างเซลลูโลสน้ำหนักแห้งได้เพียง 0.1800 กรัมต่อลิตร ส่วนที่สภาวะเขย่าผลิตได้ 1.7275 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลสที่สามารถผลิตเซลลูโลสให้ได้ปริมาณมาก และอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Acetobcter* นั้น ปัญหาที่พบในการศึกษาครั้งนี้ คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษา พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง slant ในหลอดทดลองธรรมดาไม่เพียงพอต่อปริมาณที่จะทำเป็นเชื้อเริ่มต้น จึงควรหาอุปกรณ์ที่สามารถเพิ่มพื้นที่ในการเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นให้มากกว่านี้ เช่นขวดที่มีลักษณะเหลี่ยมหรือขวดแบนที่สามารถบรรจุอาหารเอียงให้ได้พื้นที่มากๆ

การเก็บรักษาเชื้อ (stock cullture) *Acetobacter* มักประสบปัญหาเนื่องจากเชื้อมีความไม่คงที่และมีความแปรผันทางสายพันธุ์ได้ง่าย ในสภาพการเก็บเชื้อในอาหารเหลวหรือ ในอาหารแข็ง ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อในสภาพที่ดีนั้นควรจะเก็บอยู่ในรูปของสภาพแห้งผง (lyophilyte)

เมื่อพิจารณาชนิดและสภาวะการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ปริมาณเซลลูโลสที่มาก จากสภาวะนิ่ง สภาวะเขย่า และ สภาวะในถังหมัก ซึ่งเป็นเพียงแค่พื้นฐานเท่านั้น และการผลิตเซลลูโลสไม่มีความแตกต่างกันมากนัก ดังนั้นควรหาแนวทางที่ทำให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นมากกว่านี้ต่อไป เช่นการเพิ่มออกซิเจนโดยใช้ปั๊มลมที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนได้ หรือการเพิ่มตัวยึดเกาะเพื่อให้เชื้อสามารถสร้างเซลลูโลสได้เพิ่มขึ้น เป็นต้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตของเชื้อ *Acetobacter* sp. ชนิดนี้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

การวิจัย, กอง. 2531. พืชเส้นใย วัตถุดิบสำหรับผลิตเยื่อกระดาษ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กรกฎาคม : 1-14. กรุงเทพมหานคร

ณัฐพล ฟ้าภิญโญ."ผลของออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่อการผลิตเซลลูโลส"วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2540.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ**. โอเดียนสโตร์ กรุงเทพมหานคร. 202 หน้า.

นภา โล่ห์ทอง. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์. บทปฏิบัติการ Determinative Bacteriology. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประภาศรี ภูวเสียร. 2532. ใยอาหาร : ชนิดคุณสมบัติของใยอาหารและแหล่งอาหารใน : ก้าวไปกับโภชนาการเพื่อสุขภาพ การประชุมวิชาการโภชนาการ. มหาวิทยาลัยมหิดล.

วิภา สุโรจนะเมธากุล, ตวิษา โลหะนะ, พะยอม อัตถวิบูลย์กุล และ บุญมา นิยมวิทย์. 2541. การใช้กากดอกกระเจี๊ยบและเปลือกถั่วเหลืองเพื่อผลิตเซลลูโลสผง. **วารสารอาหาร**. 28 (4) : 255-269.

ศศิเกษม ทองยง และ พรรณี เดชกำแหง. 2530. **เคมีอาหารเบื้องต้น**. โอเดียนสโตร์ : กรุงเทพมหานคร. 208 หน้า.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2527. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

สันทนา อมรไชย. 2537. ใยอาหาร. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ**. 42 (135) : 27-33.

อรรณพ วราอัศวปติ. 2532. **เทคโนโลยีและสรีรวิทยาหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้และผักสด** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Brown,A.J. 1886. On an acetic ferment which froms cellulose. J.Chem.Soc. 49:432-439.

Brown, R.M., Jr., Willison, J.H.M., and Richardson, C.L. 1976. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum* : visualization of the synthesis and directmeasurement of the in vivo process. Proc. Notl. Acad. Sci. USA. 73. 4565-4569.

Cook,K.and J.Colin. 1980. Evidence for beneficial influence of cellulose production on growth of *Acetobacter xylinum* in liquid medium. **Curr.Microbiol.** 3 : 203-205.

Coron and Jonson. 1986. Isolation Screening and characterization of cellulose-utilizing bacteria. **Philippine J. Science.** 223-227.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Deinema, M.H., and L.P.T.M. Zevenhuizen. 1971. Formation of Cellulose fibrils by gramnegative bacteria and their role in flocculation. **Arch.Mikrobiol.** 78 : 42-57.

Deveries, L.T. and Reinhold, V.N. 1992. Controlling dietary fiber in food products. New York : Van Nostrand Reinhold. 161 pp.

Dudman, W.F. 1960. Cellulose Production by *Acetobacter xylinum*. **J.Gen.Microbiol.** 22 : 25-30.

Fontana, J.D., Souza, A.M., Fontana, C.K., Torrianl, I.L, Moreschi, C., and Gallotti, B.S. 1990. *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Appl. Biochem. Biotechol.** 24/25 : 293.

Fontana, J.D., Franco, V.C., Souza de S.J., Lyrl, I.L. and Souza A.M. 1991. Nature of plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* ("Tea fungus") biofilm sed in skin therapy

Geyer,U., Hernzi,T., Stein,A., Klemm, D., Marsch, S., Schumann, D. and Schamuder, H.P. 1994. Formation derivatization and application of bacterial cellulose. Int. **J.Biol.Macromol.** 16 : 343-345.

Haigler, C.H. 1985. The functions and biogenesis of native cellulose. In Cellulose Chemistry and Its. Applications. T.P. Nevell and S.H. Deronian (ed.). Ellis Horwood, Chichester, England. 30-84.

Haigler, C.H., and H. Chanzy. 1988. Electron diffraction analysis of altered cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of fluorescent brightening agents and direct dyes. **J. Ultrastruct. Mol. Struct.** 98 : 299-311.

Hestrin,S. 1947. Synthesis of cellulose by resting cells of *Acetobacter xylinum*. Nature. 159 :64-65.

Holt. et.al. 1994. Bergey's manual of Determinative Bacteriolog, 9th ed., Williams & Wilkins, Baltimore.

Ishikawa, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T. and Yoshinaga., F. 1995. Increase in cellulose production by sulfaguanidine resistant mutants derived from *Acetobacter xylinum* subp. Sucrofermentans. **Biosci. Biotech Biochem.** 59 : 2259 -2262.

Kent,R.A., Stephen, R.A. and Westland, K.J. 1991. Bacterial Cellulose fiber provides an alternative for thickening and coatining. **Food.Technol.** 45 :108.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kondo,T and M.Kondo. 1996. Efficient production of acetic acid from glucose in a mixed culture of *Zymomonas mobilis* and *Acetobacter* sp. **J.Ferment.Bioeng** 81 : 42-46.

Kouda, T., Nagata, Y., Yano, H. and Yoshinaga. F., 2000. Method for cultivating apparatus for the production of bacterial cellulose in and aerated and agitated culture. Bio Polymer. Available : http://www.United States Patent. 6.017.740

Kouda, T., Naritome, T. and Yoshinaga, F. 1997. Effects of oxygen and carbondioxide pressure on Bacterial Cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated Culture. **J.Ferment.Bioeng.** 84 : 124-217.

Krieg, N.R. and Holt, J.C. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, ed. Williams & Wilkins, Baltimore. 1. 271-274.

Krusong, W., Takagi, K.M. and Yoshida, T. 1995. Cellulose porous bread as microaerophilic carrier for enchancing cellulosep Production in agitated culture of *Acetobacter xylinum* Ann. Rep. ICBiotech.

Krusong, W., Phainyo, N. and Yoshida, T. 1998. Counteraction of negative effect on cellulose production in agitated submerged culture of *Acetobacter xylinum*. Asian Network on Microbial Resarches:Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia. 521-527 pp.

Lapuz. MM., Gallardo, EG. And Palo, MA. 1967. The nata organism-cultural requirements, characteristics and identify. **Phillippine. J. Science.** 96:91-109.

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

Matsushita, K., Toyama, H., and Adachi, O. 1994. Respiratory chain and bioenergetics of acetic acid. bacteria. In. Rose. A.H. and Tempest, D.W. (ed.), Advances in microbial physiology. Academic Pess, London. 36. 247-301.

Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H. and Yoshinaga, F. 1998. Effect of Ethanol on Bacterial Cellulose Production from Fructose in Continuous Culture. **J. Ferment Bioeng.** 85. (6) 598-603.

Oikawa, T., Morino. T. and Aneyana, M. 1995. Production of cellulose from D-Arabitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. **Biosci.Biotech.Biochem.** 59 :1564-1565.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oikayama, A., Motoki, M. and Yamanaka, S. 1992. Bacterial Cellulose. II. Processing of the gellatinous celluose for food materials. **Food Hydrocol.** 6 :479-489.

Ring et.at. 1986. US Patent No.4588400.

Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. 1991. Cellulose biosynthesis and function in baceria. **Microl. Rev.** 55 :35-58.

Sanchez, P.C. 1990. Nata de Coc.. In. Coconut as Food. Phil.Coco. Res. Dev. Foundation Publication. Philippines. 185-199.

Schramm, M. And S. Hestrin. 1954. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. **J. Gen. Microbiol.** 11 : 123-129.

Seto, A., Kojima, Y., Tonuchi, N., Tsuchida, T., and Yoshinaga, F. 1997. Screenig of Bacterial Cellulose producing. *Acetobacter* Strain Suitable for Sucrose as a Carbon Source. **Biosci. Biotech. Biochem.** 61 (4). 735-736.

Somporn, M., K. Kawabata., S. Tanaka., H. Toyama., O. Adachi and K. Matsushita. 2002. A Novel Polysaccharide Involed in the Pellide Formation of *Acetobacter aceti*. **J.Biosci. Biogeng.** 93. (2). 192-200.

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

Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T. and Yoshinaga, F. 1995. Screening of bacterial cellulose-producting *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. **Biosci. Biotech. Biochem.** 59 : 1498-1502.

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. **J. Biosci. Bioeng.** 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. **Biosci. Biotech. Biochem.** 59 (1). 65-68.

Williams, W.S. and R.E. Cannon. 1989. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. **Appl. Env. Microbiol.** 55 : 2448-2452.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yamanaka, S. 1989. Production and application of bacterial cellulose. In. H Inagaki and G.O. Phillips (eds), Cellulosic utilization : Research and rewards in Cellulose. Elsevier/North-Holland Publ.Co., Amsterdam. 171-185.

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

Yamanaka, S and K. 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., Pyun, Y.R., and Kim, Y.S. 1998. Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under Agitated Condition. **J. Ferment. Bioeng.** 85. (3). 312-317.

Yoshino, T., Asakura, T., and Toda, K. 1996. Cellulose production by *Acetobacter pasteurianus* on silicone membrane. **J. Ferment. Bioeng.** 81. 32-36.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
วิธีวิเคราะห์

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) (ดวงพร คันธโชติ. 2537)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง
2. สไลด์
3. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หรือ 30 เปอร์เซ็นต์

วิธีการทดสอบ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ แตะลงบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ลงไปบนเชื้อที่แตะไว้ สังเกตผลถ้าเกิดฟองก๊าซขึ้นแสดงว่าแบคทีเรียดังกล่าวสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ บันทึกผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดฟองก๊าซบันทึกผลเป็นลบ (เชื้อบางชนิดอาจสร้างเอนไซม์คะตะเลสน้อย หรือให้ผลการทดสอบแบบอ่อนๆ โดยจะเกิดฟองก๊าซน้อยมาก)

การทดสอบอีกแบบหนึ่ง คือ อาจหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนโคโลนีของเชื้อที่อยู่บนผิวหน้าอาหารโดยตรง แล้วสังเกตฟองก๊าซ ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่นิยม

การทดสอบ Oxidative fermentative (O/F test) (นภา โล่ห์ทอง. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง
2. อาหาร oxidative-fermentative medium (Hugn and Leifson's semisolid รายละเอียดตามภาคผนวก ข หมายเลข10) เข็มเขี่ยปลายแหลม (needle)
3. พาราฟินเหลวไร้เชื้อ (liquid paraffin)

วิธีการทดสอบ

1. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา ซึ่งมีอายุ 24-48 ชั่วโมง แล้วปลูกเชื้อแบบปักตรง (stab inoculation) ตลอดความลึกของอาหารทดสอบ oxidative-fermentative เชื้อละ 2 หลอด

2. รีบเทพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อปิดทับผิวหน้าของอาหารเหลวให้หนาประมาณ 1 นิ้ว เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพไร้อากาศ (ออกซิเจน) ส่วนหลอดที่สองไม่ต้องเทพาราฟินปิดทับเพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพที่มีอากาศ (ออกซิเจน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำหลอดเชื้อทั้งสองไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือ 37 องศาเซลเซียส ตรวจผลทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เชื้อที่เป็น fermentative จะสร้างกรดในอาหารทั้งสองหลอด หรือเฉพาะหลอดที่มีพาราฟินปิดทับ ส่วนเชื้อที่เป็นออกซิเดทีฟ (oxidative) จะให้กรดเฉพาะหลอดที่ไม่มีพาราฟิน ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ (indicator) คือ บรอมไธมอลบลู (bromthymol blue) จากสีเขียวเป็นสีเหลืองดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

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

การทดสอบเมทิลเรด (Methylred test) (นภา โล่ห์ทอง. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา อายุ 24-48 ชั่วโมง
2. อาหาร MR-VP broth (ภาคผนวก ข หมายเลข 6)
3. หลอดทดสอบขนาดเล็ก
4. ปิเปตขนาด 2 มิลลิลิตร หรือหลอดหยด
5. สารละลายเมทิลเรด

วิธีการทดสอบ

1. ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร MR-VP broth จำนวน 2 หลอด
2. บ่มเชื้อแบคทีเรียที่ปลูกลงใน MR-VP broth แล้ว ที่อุณหภูมิห้องหรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 5 วัน
3. ตรวจผลครั้งแรกบ่มเชื้อครบ 2 วัน โดยแบ่งอาหารมาประมาณ 2 ถึง 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบขนาดเล็ก จากนั้นหยดสารละลายเมทิลเรดประมาณ 1 ถึง 2 หยด แล้วสังเกตผล

ถ้าสารละลายเมทิลเรดเปลี่ยนเป็นสีแดงบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลเป็นบวก (+) ถ้าเมทิลเรดเปลี่ยนเป็นสีเหลืองบันทึกผลเป็นลบ (-) ถ้าเมทิลเรดเปลี่ยนเป็นสีส้ม แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างกรดได้ แต่กรดเกิดขึ้นช้า หรือยังมีปริมาณน้อย ให้บ่มเชื้อต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปอีกประมาณ 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาทดสอบใหม่ (การตรวจผลเมทิลเรดบางแห่งอาจตรวจผลนานถึง 7 วัน เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) การตรวจผลต้องทำเทียบกับหลอดคุม

การทดสอบ VP (Voqes-Proskauer (VP) Test) (นภา โล่ห์ทอง. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา อายุ 24-48 ชั่วโมง
2. อาหารเหลว เอ็มอาร์-วีพี (MR-VP broth) (ภาคผนวก ข หมายเลข 6)
3. สารละลายแอลฟาแนพทอล (α-napthol) เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์
4. สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์
5. ปิเปต 2 มิลลิลิตร หรือหลอดหยด
6. หลอดทดสอบขนาดเล็ก

วิธีการทดสอบ

1. ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร MR-VP broth จำนวน 2 หลอด
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง หรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 5 วัน
3. ตรวจผลเมื่อครบ 2 วัน โดยดำเนินการดังนี้

แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อมาจำนวน 1 ถึง 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบขนาดเล็ก หยดสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ แอลฟาเนพทอล (α-napthol) จำนวน 0.6 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหยดสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ตามลงไป เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วอ่านผล

การอ่านผล

- ถ้าเกิดสีแดงชมพูขึ้นภายในเวลาประมาณ 10 นาที บันทึกผลเป็นบวก ถ้ามีเหลืองหรือสีอื่น ๆ ให้ตั้งทิ้งไว้เพื่อตรวจสอบผลภายในเวลา 4 ชั่วโมง ทั้งนี้เพราะปฏิกิริยาการเกิดสีอาจเกิดขึ้นช้า ถ้าสีแดงชมพูภายในเวลาดังกล่าว ให้บันทึกผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดสีแดงชมพูบันทึกผลเป็นลบ กรณีที่เกิดสีแดงแบบสีของโลหะทองแดง ถือว่าผลเป็นลบ ในกรณีผลลบให้บ่มเชื้อต่อไปจนครบ 5 วันแล้วทำการทดสอบอีกครั้งหนึ่ง

หมายเหตุ

1. การหยดสารละลายต้องทำตามลำดับขั้น คือ เติม 5 เปอร์เซ็นต์ แอลฟาแนพทอล (α-napthol) ก่อนแล้วตามด้วย 40 เปอร์เซ็นต์ โปแตสเซียมไฮดรอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซด์ (potassium hydroxide) ห้ามสลับขั้นตอนเด็ดขาด เพราะผลจะผิดพลาด

2. การหยดสารละลายแอลฟาแนพทอล (α-napthol) กับโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) อาจไม่ต้องใช้ 0.6 มิลลิลิตรก็ได้ แต่ให้ใช้ในอัตราส่วนแอลฟาแนพทอลต่อโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เป็น 3:1 หรือใช้แอลฟาแนพทอล (α-napthol) ให้มากกว่าโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide)
3. การตรวจผลบางครั้งอาจตรวจทุกวันจนครบ 7 วัน
4. การตรวจผลที่แน่นอนต้องทำเทียบกับหลอดคุม

การทดสอบการสร้างสารอินโดล (Indole) (นภา โล่ห์ทอง. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์)

อุปกรณ์และสารเคมี

วิธีการทดสอบ

1. ปลูกเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา ลงในอาหาร tryptone broth (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) ในหลอดทดสอบ จำนวน 2 หลอด
2. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลานำมาทดสอบอินโดล โดยหยดสารละลาย Kovac's reagent ประมาณ 0.5-1.0 มิลลิลิตร (ประมาณ 2-3 หยด) ลงในหลอดอาหารที่เลี้ยงเชื้อไว้ เขย่าเบา ๆ ให้สารละลายผสมกันตั้งทิ้งไว้สักครู่

สังเกตผล

ถ้าเกิดสีแดงลอยอยู่ชั้นบนของอาหารเหลวแสดงว่ามีสารอินโดลเกิดขึ้น บันทึกผลเป็นบวก (+)

ถ้าไม่เกิดสีแดงแสดงว่าไม่มีสารอินโดล บันทึกผลเป็นลบ (-)

การทดสอบควรทำเทียบกับหลอดคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

หมายเหตุ

1. ถ้าเกิดเป็นสารอื่น ๆ เช่น สีส้ม สีช้ำเลือดช้ำหนอง ซึ่งอาจเนื่องมาจากการออกซิไดส์ tryptophan แล้วเกิดเป็นสารอื่น ๆ เช่น เมทิล อินโดล (methyl indole) ผลการทดสอบด้วย Kovac's reagent จะได้สีส้ม เป็นต้น ให้บันทึกผลเป็นลบ
2. สารอินโดล อาจเกิดขึ้นได้หลังบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลานานกว่านี้ อาจให้ผลเป็นลบได้ ดังนั้นควรแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบสารอินโดล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประมาณ 1 ถึง 2 มิลลิลิตร เมื่อบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาทดสอบอีกครั้งเมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง

การทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ [Hydrogen sulfide (H_2S) Production Test] (นภา โล่ห์ทอง. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา อายุ 24-48 ชั่วโมง
2. อาหารวุ้นทีเอสไอ (TSI) ผิวเอียง (ภาคผนวก ข หมายเลข 8)

วิธีการทดสอบ

1. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) แตะเชื้อลงใน triple sugar iron agar slant โดยปัดไปมา (streak) ที่ผิวของพื้นเอียง (slant) แล้วแทงลง (stab) ลงไปที่ส่วนก้นหลอด เรียกว่าทำ butt

2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง หรือ 37 องศาเซลเซียส และตรวจผลภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงควรเก็บหลอดไว้ตรวจผลจนครบ 5 วัน

สังเกตดูการเปลี่ยนสีของอาหารและการเกิดก๊าซ

ถ้าการทดสอบใช้ TSI medium ซึ่งมีน้ำตาล 3 ชนิด คือ

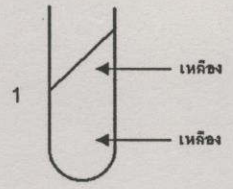
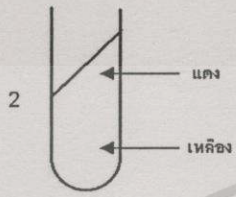
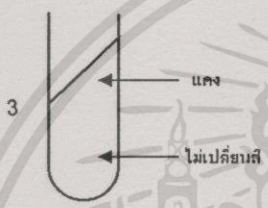
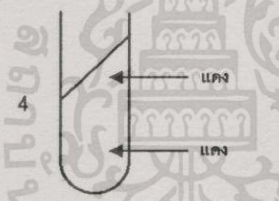
กลูโคส (glucose) 1 ส่วน

แลกโตส (lactose) 10 ส่วน

ซูโครส (sucrose) 10 ส่วน

มี phenol red เป็น indicator แบคทีเรียจะใช้น้ำตาลโดยกระบวนการ fermentation ที่ก้นหลอด แต่ที่ผิวพื้นเอียงของอาหาร (slant) จะใช้กระบวนการ respiration และการใช้สารประกอบไนโตรเจนในอาหารทำให้ได้สารที่มีสภาพเป็นด่าง ดังนั้นแบคทีเรียใช้กลูโคส เพียงอย่างเดียว จะเกิดกรดปริมาณน้อย จึงเกิดสีเหลืองเฉพาะก้นหลอด ส่วนผิวพื้นเอียงจะมีสีแดงเนื่องจากสภาพด่าง แต่ถ้าแบคทีเรียใช้น้ำตาลแลกโตส หรือ ซูโครส ด้วยจะมีสีเหลืองเกิดที่ผิวพื้นเอียง เพราะเกิดกรดปริมาณมาก ถ้าเกิดก๊าซจากการใช้น้ำตาลจะมีฟองอากาศแทรกอยู่ในอาหาร บางครั้งถ้าก๊าซมาก ก็จะดันให้อาหารลอยขึ้นจากก้นหลอด และถ้าเป็นเชื้อที่ผลิต H_2S ด้วยจะเกิดสีดำของเฟอรัสซัลไฟด์ ตามรอยที่ปลูกเชื้อ ถือว่าให้ผลเป็นบวก ดังตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการเปลี่ยนแปลง	บันทึกผล
	A / A
	K / A
	K / NC
	K / K
	NC / NC
การเปลี่ยนแปลงหมายเลข 1-4	A /A, H_2S
ถ้ามีสีดำเกิดขึ้นแสดงว่ามี	K / A, H_2S
ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	

การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate Fermentation Test) (นภา โล่ห์ทอง. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา อายุ 24-48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

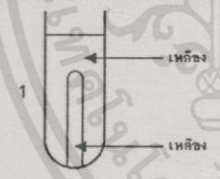
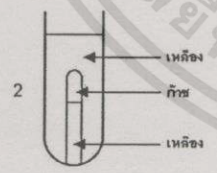
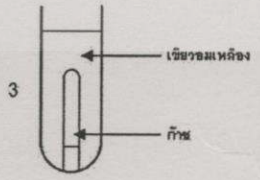
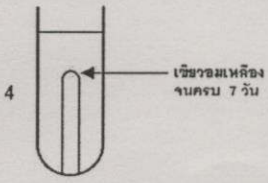
2. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยเลือกใช้ Basal medium ที่เหมาะสม แล้วเติมคาร์โบไฮเดรต 0.5-2 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดสอบและภายในบรรจุหลอดดักก๊าซไว้ด้วย

3. ตู้บ่มเชื้อ

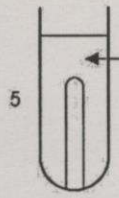
วิธีการทดสอบ

1. ปลูกเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ลงในอาหารที่ใช้ทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิด (สำหรับคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส กาแลคโตส แลคโตส มอลโตส แมนนิทอล ซูโคส อะราบิโนส ไซโลส กลูโคเนท เป็นต้น) แต่ละชนิดทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) หรือที่ 37 องศาเซลเซียส ตรวจผลการสร้างกรดและก๊าซทุกวันจนครบ 7 วัน ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักคาร์โบไฮเดรต และสร้างกรดขึ้น จะทำให้อาหารมีพีเอชต่ำลง และสีของอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนไป โดยถ้าใช้บรอมไธมอลบลูเป็นอินดิเคเตอร์ก็จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง หรือถ้าใช้บรอมครีซอลเพอร์เฟิลเป็นอินดิเคเตอร์ ก็จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และถ้าสามารถสร้างก๊าซได้ ก๊าซก็จะเข้าไปแทนที่อาหารเหลวในหลอดดักก๊าซ การบันทึกผลการทดลองที่แน่นอนนั้นควรเทียบกับหลอดคุม (control) ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

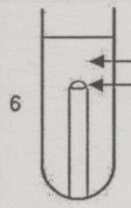
ตัวอย่างการแปรผลและบันทึกผล

ลักษณะการเปลี่ยนแปลง	การแปรผล	การบันทึกผล
	เชื้อสร้างกรดแต่ไม่สร้างก๊าซ	+ หรือ A
	เชื้อสร้างกรดและก๊าซ	+ หรือ A หรือ + , G หรือ A, G
	เชื้อสร้างกรดได้เพียงเล็กน้อย	SL^3
	และสร้างก๊าซ เชื้อสร้างกรดได้เล็กน้อย แต่ไม่สร้างก๊าซ	DL^4

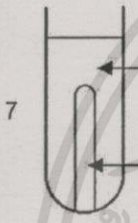
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



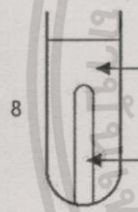
เชื้อสร้างกรดได้ช้า แต่ไม่สร้างก๊าซ +



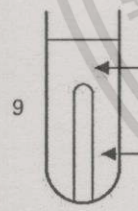
เชื้อสร้างกรดได้แต่การสร้างก๊าซยังไม่แน่นอน หรืออาจสร้างได้แต่น้อยมาก ยังไม่เป็นที่ยอมรับจนอาจถือได้ว่าเป็นลบ +



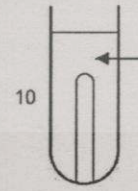
เชื้อสร้างกรดได้แต่ไม่สร้างก๊าซ +



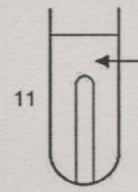
เชื้อสร้างกรดได้แต่ไม่สร้างก๊าซ +



เชื้อสร้างกรดได้แต่ไม่สร้างก๊าซ +

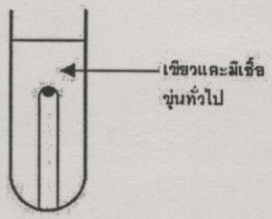
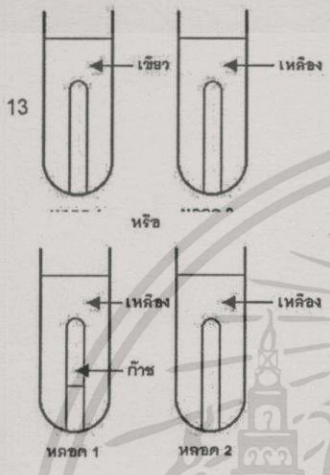


เชื้อสร้างสารประเภทด่าง -



เชื้อสร้างกรดได้แล้วต่อมาสร้างสารประเภทด่าง +

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12		เชื้อไม่สร้างกรดหรือก๊าซ	
13		1. เชื้ออาจไม่บริสุทธิ์ 2. เชื้ออาจมี variation เนื่องจากเก็บไว้ใน stock นานเกินไปจนไม่สามารถปรับตัวใช้คาร์โบไฮเดรตได้ 3. ปริมาณเชื้อที่ปลูกในแต่ละหลอดอาจไม่เท่ากัน	1. ทำเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วทำใหม่ 2. ปลูกเชื้อลงในคาร์โบไฮเดรตชนิดนั้นซ้ำใหม่ 2-3 ครั้ง 3. ทำซ้ำโดยใช้ปริมาณเชื้อเท่ากัน

หมายเหตุ

1. การเปลี่ยนแปลงต้องเหมือนกันหรือใกล้เคียงกันทั้งสองหลอด
2. A : acid and gas
3. slightly acid
4. delayed acid producing

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเหล่านี้ผสมกับน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121 องศาเซลเซียส) นาน 15 นาที ยกเว้นสูตรอาหารบางสูตรที่จะระบุไว้โดยเฉพาะ อาหารทุกชนิดเตรียมเสร็จแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง อย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้

1. Hestrin and Schramm, (1954)

Glucose	2	เปอร์เซ็นต์
Yeast Extract	0.5	เปอร์เซ็นต์
Peptone	0.5	เปอร์เซ็นต์
Na_2HPO_4	0.27	เปอร์เซ็นต์
Citric acid	0.12	เปอร์เซ็นต์
pH 5		

2. Alaban, (1962)

Sucrose	10	เปอร์เซ็นต์
Ethanol	2.5	เปอร์เซ็นต์
Yeast Extract	0.25	เปอร์เซ็นต์
$(NH_4)_2SO_4$	0.06	เปอร์เซ็นต์
KH_2PO_4	0.5	เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4.7\ H_2O$	0.02	เปอร์เซ็นต์
pH 5		

3. Forang, (1989)

Glucose	2.0	เปอร์เซ็นต์
NH_4Cl	0.1	เปอร์เซ็นต์
Na_2HPO_4	0.27	เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4.7\ H_2O$	0.02	เปอร์เซ็นต์
pH 5		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Oklyama, (1992)

Sucrose	10	เปอร์เซ็นต์
Yeast Extract	0.5	เปอร์เซ็นต์
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	เปอร์เซ็นต์
KH_2PO_4	0.3	เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4.7\ H_2O$	0.02	เปอร์เซ็นต์

pH 5

5. Coconut Water Agar

น้ำมะพร้าว	100	เปอร์เซ็นต์
วุ้น	1.5	เปอร์เซ็นต์

pH 5

6. MR-VP broth (MR-VP medium or Methyl red-Voges Proskaver test medium)

Polypeptone	7.0	กรัม
Dextose	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	5.0	กรัม
Disstilleded water	1000	มิลลิลิตร

pH 6.9-7.2

ใส่ลงในหลอดแก้ว และนำไปนึ่งภายใต้ความดัน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว) ที่อุณหภูมิ 118-121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. 1 เปอร์เซ็นต์ Peptone water สำหรับ Indole test

Peptone	10.0	กรัม
Disstilled water	1000	มิลลิลิตร

ใส่ลงในหลอดแก้ว และนำไปนึ่งภายใต้ความดัน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว) ที่อุณหภูมิ 118-121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. Triple Sugar Iron agar (TSI agar)

Polypeptone	20.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Dextose	1.0	กรัม
Ferrous ammonium sulfate	0.2	กรัม
Sodium thiosulfate	0.2	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Agar	13.0	กรัม
Disstilled water	1000	มิลลิลิตร

ใส่ลงในหลอดแก้ว และนำไปนึ่งภายใต้ความดัน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว) ที่อุณหภูมิ 118-121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (โดยทำ butt และเอียง slant)

9. อาหารทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (Fermentation Carbohydrate medium)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำตาล	10.0	กรัม
Bromthymol blue 1.6 เปอร์เซ็นต์	4.0	กรัม

pH 6.8-7.0

การเตรียมน้ำตาลแต่ละชนิด ควรเตรียมหลอดทดสอบที่ใส่หลอดดักก๊าซไว้แล้ว ไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงเตรียมน้ำตาลใส่หลอดละประมาณ 6 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอเพียง 10 ปอนด์ เป็นเวลา 10 นาที รีบยกออกมาแช่น้ำเย็นทันที ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำตาลแตกตัว เพราะจะคุณสมบัติของน้ำตาลแต่ละชนิดไป

10. อาหารทดสอบการออกซิไดส์และการหมัก (Hugh and Leifson's O.F medium)

Basal medium ประกอบด้วย	2.0	กรัม
Peptone	0.3	กรัม
K_2HPO_4	5.0	กรัม
NaCl	3.0	กรัม
Agar	3.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bromthymol blue 0.2 aq.solution 15.0 กรัม

ละลายส่วนประกอบของ Basal medium แล้วปรับพีเอชให้ได้ประมาณ 7.1 เติม bromthymol blue 1.6 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 มิลลิลิตร ลงเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วเติม กลูโคส 10 กรัม ผสมลงในอาหาร สีของอาหารจะเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน บรรจุใส่ลงในหลอดทดสอบประมาณ 6-7 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที รีบยกออกมาแช่น้ำเย็นทันทีทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำตาลแตกตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สีย้อมและสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการย้อม

1. **อะซิโตน-แอลกอฮอล์** (Acetone alcohol)

เอทานอล (95 เปอร์เซ็นต์)	700	มิลลิลิตร
อะซิโตน	300	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน

2. **สารละลายไอโอดีน** (Lugol's for gram staining)

ไอโอดีน	1.0	กรัม
โปแตสเซียม ไอโอไดด์ (potassium iodide)	2.0	กรัม

ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำลงไปเล็กน้อยจนกระทั่งไอโอดีนละลายหมด

เติมน้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

3. **ซาฟรานิน-โอ** (Safranin-O)

ซาฟรานิน-โอ (สารละลาย 2.5 กรัม ใน เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4. **แอมโมเนียมออกซาเลท คริสตัลไวโอเลต** (Ammonium oxalate crystal violet)

คริสตัลไวโอเลต	2.0	กรัม
เอทานอล (95เปอร์เซ็นต์)	20.0	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันจากนั้นเติมสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมออกซาเลต จำนวน 80 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีและน้ำยาทดสอบต่าง ๆ

1. 3 เปอร์เซ็นต์ Hydrogen peroxide solution

H_2O_2	3.0	กรัม (คำนวณจากฉลากข้างขวด)
H_2O	100	มิลลิลิตร

2. Kovac's solution

Para-dimethyl-amino benzaldehyde	5.0	กรัม
Amyl or buttyl alcohol	75	มิลลิลิตร
HCl, concentrate	25	มิลลิลิตร

ผสม para-dimethyl amino benzaldehyde กับ alcohol ใน water bath อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส 5 นาที ขณะปล่อยให้เย็นริน HCl ลงไป เขย่าให้เข้ากันเก็บในขวดสีชาใส่ไว้ในตู้เย็น

3. Methyl red solution

Methyl red	0.8	กรัม
Ethanol 95%	300	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

ละลายสี methyl red ใน Ethanol 95% แล้วจึงเติมน้ำกลั่น

4. Voges-Proskauer test solution

Solution A :

Alpha napthol	10	กรัม
Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิลิตร

ละลาย alpha napthol ใน Ethanol 95% เก็บใส่ขวดสีชา

Solution B :

KOH	20	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย KOH ในน้ำกลั่นเก็บในขวดสีน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. **Bromthymol blue solution 1.6 เปอร์เซ็นต์**

Bromthymol blue	1.6	กรัม
Ethyl alconol	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลจากการทดลอง

การสร้างเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรียเซลูโลสจากตัวอย่างผลไม้เน่าเสียจำนวน 106 ชนิด

รหัส	สภาวะนิ่งปริมาณการสร้างเซลลูโลส	สภาวะเขย่าปริมาณการสร้างเซลลูโลส
A-11	+++	gel ++++
A-12	++	pellicle ++
A-13	++	+
A-14	++	+
A-15	+	+
A-16	++	++
A-17	++	++
A-21	++	+
A-22	++	+
A-23	++	++
A-24	++	++
A-25	+	gel ++
A-26	+	+
A-27	++	gel ++
A-28	++	+
A-29	++	+
A-31	+	gel ++
A-32	++	gel ++
A-33	++	gel ++
A-34	++	+
A-35	+	++
A-36	+	+
A-37	++	gel ++
A-38	++	++
A-39	+	+

A = ตัวอย่างจากองุ่นเน่าเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลจากการทดลอง (ต่อ 2)

การสร้างเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรียเซลูโลสจากตัวอย่างผลไม้เน่าเสียจำนวน 106 ชนิด

รหัส	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า	
	ปริมาณการสร้างเซลลูโลส		ปริมาณการสร้างเซลลูโลส
B-11	+		++
B-12	+		++
B-13	+	gel	+++
B-14	++	gel	+
B-15	+		+
B-16	+	gel	++
B-17	++		++
B-18	++		+
B-19	+		+
B-110	++		++
B-21	++	pellicle	++
B-22	++	gel	++
B-23	++		+
B-24	+	gel	++
B-25	++		+
B-26	++		+
B-31	+	gel	++
B-32	++		++
B-33	++		++
B-34	++		+
B-35	++	gel	++
B-36	++		+
B-37	++		++
B-38	++		++
B-39	++++	gel	++++
B-310	+++	gel	+

B = ตัวอย่างจากสับปะรดเน่าเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลจากการทดลอง (ต่อ 3)

การสร้างเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรียเซลูโลสจากตัวอย่างผลไม้เน่าเสียจำนวน 106 ชนิด

รหัส	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
	ปริมาณการสร้างเซลลูโลส	ปริมาณการสร้างเซลลูโลส
C2-2	+	++
C2-3	+	++
C2-4	+	+
C2-6	+	++
C2-7	+	+
C2-8	+	+
C2-9	+	+
C2-10	+	+
C2-11	+	++
C2-12	+	+
C2-13	++	++
C2-15	+	++
C2-16	+	+
C2-17	+	+
C2-18	+	+
C3-1	+	+
C3-2	+	+
C3-3	+	+
C3-4	+	+
C3-5	+	+
C3-6	+	+
C3-7	+	+
C3-8	+	+
C3-9	+	+
C3-10	+	+
C4-1	+	+
C4-2	+	+
C4-3	+	+
C4-4	+	++

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลจากการทดลอง (ต่อ 4)

การสร้างเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรียเซลูโลสจากตัวอย่างผลไม้เน่าเสียจำนวน 106 ชนิด

รหัส	สภาวะนิ่ง ปริมาณการสร้างเซลลูโลส	สภาวะเขย่า ปริมาณการสร้างเซลลูโลส
C4-5	+	+
C4-6	+	+++
C4-8	++	+++
C6-1	+	+
C6-2	+	+
C6-3	+	+
C6-5	+	+
C6-6	+	+
C6-8	+	+
C6-9	+	+
C7-1	+	+
C7-2	+	+
C7-3	+++	++++
C7-4	+	+
C7-5	+	++
C7-7	+++	+++
C7-10	++	++++
C8-1	+	+
C8-2	+	++
C8-3	+	+++
C8-4	++	+
C8-5	+	+
C8-6	+	++++
C8-7	+	++
C8-8	+	+
C8-9	++	+++
C8-10	+	+
C8-11	++	+++

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลจากการทดลอง (ต่อ 5)

การสร้างเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรียเซลูโลสจากตัวอย่างผลไม้เน่าเสียจำนวน 106 ชนิด

รหัส	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
	ปริมาณการสร้างเซลลูโลส	ปริมาณการสร้างเซลลูโลส
C8-12	+	+++
C8-13	+	+
C8-14	+	+++
C8-15	+	++
C8-16	+	+++
C8-17	+	++
C8-18	+	+
C8-19	+	+++
C8-20	+	+++

C = ตัวอย่างจากเงาะเน่าเสีย

\+ มีการสร้างเซลลูโลสปริมาณน้อย

++ มีการสร้างเซลลูโลสปริมาณปานกลาง

+++ มีการสร้างเซลลูโลสปริมาณมาก

++++ มีการสร้างเซลลูโลสปริมาณมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 การผลิตเซลลูโลสในหลอทดลองบรรจุอาหาร BSH meduim 5 มล.

รหัส	สภาวะนิ่ง								สภาวะเขย่า							
	น้ำหนักแห้งทั้งหมด (กรัม)				น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง (กรัม)				น้ำหนักแห้งทั้งหมด (กรัม)				น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง (กรัม)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
A-11	0.0052	0.0041	0.0065	0.0053	0.0023	0.0020	0.0017	0.0020	0.0074	0.0062	0.0059	0.0065	0.0034	0.0031	0.0030	0.0032
B-13	0.0051	0.0064	0.0055	0.0057	0.0024	0.0026	0.0025	0.0025	0.0073	0.0069	0.0084	0.0075	0.0036	0.0041	0.0037	0.0038
B-39	0.0040	0.0051	0.0057	0.0049	0.0015	0.0021	0.0018	0.0018	0.0082	0.0064	0.0073	0.0073	0.0033	0.0037	0.0035	0.0035
C4-6	0.0041	0.0100	0.0064	0.0068	0.0016	0.0020	0.0021	0.0019	0.0057	0.0186	0.0082	0.0108	0.0029	0.0032	0.0035	0.0032
C4-8	0.0058	0.0062	0.0074	0.0065	0.0023	0.0026	0.0029	0.0026	0.0064	0.0085	0.0059	0.0069	0.0029	0.0030	0.0031	0.0030
C7-3	0.0071	0.0078	0.0086	0.0078	0.0045	0.0036	0.0033	0.0038	0.0103	0.0105	0.0098	0.0102	0.0048	0.0045	0.0048	0.0047
C7-7	0.0051	0.0057	0.0043	0.0050	0.0028	0.0035	0.0030	0.0031	0.0068	0.0075	0.0092	0.0078	0.0037	0.0042	0.0035	0.0038
C7-10	0.0040	0.0061	0.0053	0.0051	0.0025	0.0029	0.0027	0.0027	0.0113	0.0164	0.0142	0.0140	0.0094	0.0098	0.0096	0.0096
C8-3	0.0054	0.0065	0.0058	0.0059	0.0017	0.0018	0.0021	0.0019	0.0112	0.0101	0.0092	0.0102	0.0064	0.0065	0.0063	0.0064
C8-5	0.0018	0.0026	0.0034	0.0026	0.0003	0.0005	0.0004	0.0004	0.0091	0.0086	0.0075	0.0084	0.0062	0.0064	0.0063	0.0063
C8-6	0.0037	0.0072	0.0061	0.0057	0.0009	0.0011	0.0013	0.0011	0.0077	0.0092	0.0098	0.0089	0.0079	0.0084	0.0086	0.0083
C8-9	0.0036	0.0045	0.0051	0.0044	0.0021	0.0019	0.0023	0.0021	0.0065	0.0074	0.0081	0.0073	0.0027	0.0032	0.0031	0.0030
C8-11	0.0058	0.0049	0.0062	0.0056	0.0017	0.0025	0.0021	0.0021	0.0117	0.0121	0.0092	0.0110	0.0052	0.0057	0.0059	0.0056
C8-12	0.0045	0.0052	0.0061	0.0053	0.0007	0.0009	0.0011	0.0009	0.0061	0.0074	0.0058	0.0064	0.0048	0.0053	0.0055	0.0052
C8-14	0.0036	0.0042	0.0039	0.0039	0.0017	0.0021	0.0025	0.0021	0.0048	0.0041	0.0032	0.0040	0.0028	0.0033	0.0035	0.0032
C8-16	0.0047	0.0053	0.0061	0.0054	0.0023	0.0018	0.0022	0.0021	0.0066	0.0079	0.0065	0.0070	0.0039	0.0043	0.0038	0.0040
C8-19	0.0045	0.0053	0.0048	0.0049	0.0015	0.0017	0.0016	0.0016	0.0061	0.0065	0.0078	0.0068	0.0034	0.0029	0.0030	0.0031
C8-20	0.0059	0.0061	0.0042	0.0054	0.0021	0.0017	0.0019	0.0019	0.0041	0.0045	0.0053	0.0046	0.0027	0.0025	0.0029	0.0027

ตารางที่ ค.3 การสร้างเซลลูโลสจากแบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter* sp.

ลำดับที่	รหัส	สภาวะนิ่งในฟลาสก์								สภาวะเขย่าในฟลาสก์ 100 รอบ/นาที							
		น้ำหนักแห้งทั้งหมด (กรัม)				เซลลูโลสน้ำหนักแห้ง (กรัม)				น้ำหนักแห้งทั้งหมด (กรัม)				เซลลูโลสน้ำหนักแห้ง (กรัม)			
		การทดลองที่				การทดลองที่				การทดลองที่				การทดลองที่			
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
1	A-11	0.0403	0.0663	0.0445	0.0504	0.0232	0.0323	0.0223	0.0259	0.0548	0.0366	0.0813	0.0576	0.0417	0.0200	0.0382	0.0333
2	B-13	0.0477	0.0394	0.0389	0.0420	0.0320	0.0331	0.0374	0.0342	0.1238	0.0985	0.1229	0.1151	0.0721	0.0774	0.0767	0.0754
3	B-39	0.0380	0.0343	0.0368	0.0364	0.0142	0.0194	0.0173	0.0170	0.0428	0.0448	0.0462	0.0446	0.0258	0.0300	0.0321	0.0293
4	C4-6	0.0607	0.0770	0.0797	0.0725	0.0331	0.0465	0.0543	0.0446	0.0570	0.0953	0.0808	0.0777	0.0395	0.0445	0.0098	0.0313
5	C4-8	0.0505	0.0772	0.1174	0.0817	0.0253	0.0568	0.0816	0.0546	0.0779	0.0775	0.1092	0.0882	0.0486	0.0484	0.0564	0.0511
6	C7-3	0.1405	0.1275	0.1151	0.1277	0.1055	0.0945	0.0633	0.0878	0.1567	0.1693	0.1459	0.1573	0.1295	0.1363	0.0988	0.1215
7	C7-7	0.0992	0.0536	0.0370	0.0633	0.0628	0.0174	0.0239	0.0347	0.0850	0.0794	0.0628	0.0757	0.0665	0.0595	0.0438	0.0566
8	C7-10	0.1741	0.2230	0.1450	0.1807	0.1398	0.1921	0.1039	0.1453	0.2299	0.2476	0.2743	0.2506	0.2060	0.1936	0.1775	0.1924
9	C8-3	0.2149	0.1736	0.1380	0.1755	0.0998	0.1282	0.0845	0.1042	0.1747	0.2370	0.1959	0.2025	0.1459	0.2001	0.1746	0.1735
10	C8-5	0.0783	0.0679	0.0802	0.0755	0.0383	0.0283	0.0269	0.0312	0.0889	0.1217	0.1385	0.1164	0.0370	0.0506	0.1159	0.0678
11	C8-6	0.1144	0.0669	0.1314	0.1042	0.0567	0.0398	0.0799	0.0588	0.1188	0.0718	0.1062	0.0989	0.0786	0.0401	0.0954	0.0714
12	C8-9	0.0679	0.1080	0.1368	0.1042	0.0345	0.0593	0.0564	0.0501	0.0618	0.0948	0.1005	0.0857	0.0385	0.0591	0.0561	0.0512
13	C8-11	0.0997	0.2671	0.1223	0.1630	0.0350	0.1796	0.0633	0.0926	0.0754	0.1328	0.1624	0.1235	0.0672	0.0737	0.0814	0.0741
14	C8-12	0.0645	0.0847	0.1233	0.0908	0.0200	0.0414	0.0594	0.0403	0.0201	0.1007	0.0551	0.0586	0.0170	0.0460	0.0359	0.0330
15	C8-14	0.0583	0.0642	0.0832	0.0686	0.0193	0.0224	0.0348	0.0255	0.0335	0.0254	0.1016	0.0535	0.0304	0.0172	0.0270	0.0249
16	C8-16	0.1341	0.1895	0.1672	0.1636	0.0799	0.1562	0.1433	0.1265	0.1470	0.2075	0.1719	0.1755	0.1165	0.1386	0.1134	0.1228
17	C8-19	0.0561	0.2423	0.1252	0.1412	0.2506	0.1162	0.0871	0.1513	0.1640	0.1348	0.1374	0.1454	0.0621	0.0902	0.0927	0.0817
18	C8-20	0.0965	0.1422	0.1776	0.1388	0.0714	0.0728	0.0892	0.0778	0.0256	0.0397	0.0212	0.0288	0.0206	0.0157	0.0098	0.0154

ตารางที่ ค.4 เปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตจากน้ำหมักปริมาตร 100 มล. ที่สภาพการเขย่า 50 rpm., 100 rpm.

รหัส	น้ำหนักแห้งทั้งหมด							เซลลูโลสน้ำหนักแห้ง						
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		เฉลี่ย	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		
	OD 660 nm.	นน.แห้ง (g)	OD 660 nm.	นน.แห้ง (g)	OD 660 nm	นน.แห้ง (g)		OD 660 nm.	นน.แห้ง (g)	OD 660 nm.	นน.แห้ง (g)	OD 660 nm.	นน.แห้ง (g)	เฉลี่ย
C7-3	0.519	0.7980	0.518	0.8620	0.570	0.1021	0.5874	0.519	0.0573	0.518	0.0629	0.570	0.0895	0.0699
	0.509	0.1567	0.525	0.1693	0.501	0.1459	0.1573	0.509	0.1295	0.525	0.1363	0.501	0.0988	0.1215
C7-10	0.567	0.1105	0.527	0.1010	0.562	0.1125	0.1080	0.567	0.0975	0.527	0.0812	0.562	0.0989	0.0925
	0.536	0.2299	0.551	0.2476	0.581	0.2743	0.2506	0.536	0.2060	0.551	0.1936	0.581	0.1775	0.1924
C8-3	0.562	0.0448	0.547	0.0806	0.595	0.0122	0.0459	0.562	0.0282	0.547	0.0496	0.595	0.0094	0.0291
	0.053	0.1747	0.573	0.2370	0.545	0.1959	0.2025	0.053	0.1459	0.573	0.2001	0.545	0.1749	0.1736
C8-16	0.574	0.1584	0.541	0.1006	0.519	0.0968	0.1186	0.574	0.0745	0.541	0.0816	0.519	0.0743	0.0768
	0.522	0.1470	0.547	0.2075	0.565	0.1719	0.1755	0.522	0.1165	0.547	0.1386	0.565	0.1134	0.1228

เขย่าที่=50 rpm.

เขย่าที่=100 rpm.

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ ค.5 เปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลลูโลส ที่ผลิตจากน้ำหมักปริมาตร 100 มล.ที่สภาพการเขย่า 150 rpm., 200 rpm.

รหัส	น้ำหนักแห้งทั้งหมด							เซลลูโลสน้ำหนักแห้ง						
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		เฉลี่ย	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		เฉลี่ย
	OD 660 nm.	นน.แห้ง (g)	OD 660 nm	นน.แห้ง (g)	D 660 nm	นน.แห้ง (g)		OD 660 nm	นน.แห้ง (g)	OD 660 nm	นน.แห้ง (g)	OD 660 nm.	นน.แห้ง (g)	
C7-3	0.527	0.0841	0.565	0.0882	0.656	0.0885	0.0869	0.527	0.0656	0.565	0.0684	0.656	0.0661	0.0667
		0.0881		0.1253		0.0828	0.0987		0.0637		0.0601		0.0657	0.0632
C7-10	0.537	0.2183	0.547	0.1960	0.553	0.2073	0.2072	0.537	0.1690	0.547	0.1439	0.553	0.1441	0.1523
		0.1525		0.1626		0.1895	0.1682		0.1153		0.1247		0.1210	0.1203
C8-3	0.590	0.0515	0.568	0.0530	0.547	0.0837	0.0627	0.590	0.0224	0.568	0.0232	0.547	0.0767	0.0408
		0.0373		0.0514		0.0705	0.0531		0.0201		0.0243		0.0592	0.0345
C8-16	0.580	0.1010	0.596	0.1082	0.504	0.1445	0.1179	0.580	0.0887	0.596	0.1102	0.504	0.1125	0.1038
		0.1734		0.1369		0.1681	0.1595		0.1088		0.0847		0.0910	0.0948

เขย่าที่=150 rpm.

เขย่าที่=200 rpm.

เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ ค.6 การเปรียบเทียบน้ำตาลกลูโคสปริมาณต่างๆ ในการสร้างเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp.

รหัส	เปอร์เซ็นต์น้ำตาลกลโคส	สภาพนิ่ง								สภาพเขย่าในฟลาสก์							
		น้ำหนักแห้งทั้งหมด (กรัม)				น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง (กรัม)				น้ำหนักแห้งทั้งหมด (กรัม)				น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง (กรัม)			
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
C7-3	1%	0.1723	0.1061	0.1218	0.1334	0.1251	0.0914	0.0941	0.1035	0.1423	0.1301	0.1129	0.1284	0.1027	0.1121	0.1025	0.1058
	5%	0.0596	0.0854	0.0955	0.0802	0.0498	0.0635	0.0457	0.0530	0.1242	0.1128	0.1045	0.1138	0.0834	0.1010	0.0879	0.0908
	10%	0.0589	0.0919	0.0835	0.0781	0.0461	0.0792	0.0742	0.0665	0.1065	0.1044	0.0862	0.0990	0.0852	0.0906	0.0762	0.0840
	BSH 2%	0.1405	0.1275	0.1151	0.1277	0.1055	0.0945	0.0633	0.0878	0.1567	0.1693	0.1459	0.1573	0.1295	0.1363	0.0988	0.1215
C7-10	1%	0.2284	0.1916	0.2002	0.2067	0.1885	0.1601	0.1867	0.1784	0.2828	0.2125	0.1920	0.2291	0.1616	0.1871	0.1793	0.1760
	5%	0.1039	0.0910	0.1108	0.1019	0.0905	0.0750	0.0869	0.0841	0.2078	0.1678	0.1719	0.1825	0.1701	0.1529	0.1627	0.1619
	10%	0.1043	0.1006	0.1364	0.1138	0.0925	0.0917	0.1012	0.0951	0.2050	0.1521	0.1515	0.1695	0.1375	0.1213	0.1121	0.1236
	BSH 2%	0.1741	0.2230	0.1450	0.1807	0.1398	0.1921	0.1039	0.1453	0.2299	0.2476	0.2743	0.2506	0.2060	0.1963	0.1775	0.1933
C8-3	1%	0.0226	0.0612	0.0740	0.0740	0.0156	0.0594	0.0465	0.0405	0.0187	0.0205	0.0193	0.0195	0.0133	0.0198	0.0190	0.0174
	5%	0.0140	0.0239	0.0414	0.0264	0.0128	0.0312	0.0212	0.0217	0.0112	0.0105	0.0104	0.0107	0.0059	0.0087	0.0094	0.0080
	10%	0.0239	0.0414	0.0319	0.0324	0.0208	0.0251	0.1050	0.0503	0.1100	0.0199	0.0097	0.0465	0.0061	0.0072	0.0056	0.0063
	BSH 2%	0.2149	0.1739	0.1380	0.1756	0.0998	0.1282	0.0845	0.1042	0.1747	0.2370	0.1959	0.2025	0.1459	0.2001	0.1746	0.1735
C8-16	1%	0.2060	0.1527	0.1382	0.1656	0.0390	0.0257	0.0423	0.0357	0.2216	0.1624	0.1077	0.1077	0.1787	0.0924	0.0814	0.1175
	5%	0.0491	0.0654	0.0518	0.0554	0.0410	0.0177	0.0357	0.0315	0.1456	0.0562	0.0692	0.0903	0.1143	0.0513	0.0616	0.0757
	10%	0.0501	0.0611	0.0532	0.0548	0.0193	0.0224	0.0348	0.0255	0.1282	0.0795	0.0919	0.0999	0.1052	0.0678	0.0813	0.0848
	BSH 2%	0.1341	0.1895	0.1672	0.1636	0.0799	0.1562	0.1433	0.1265	0.1470	0.2075	0.1719	0.1755	0.1165	0.1386	0.1134	0.1223

ประวัติผู้เขียน

นางสาวลำพึง พุ่มจันทร์ เกิดเมื่อวันที่ 18 มกราคม พ.ศ. 2511 ที่จังหวัดพิษณุโลก สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) ในสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก เมื่อปีการศึกษา 2535 ศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ในปี พ.ศ. 2538 และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2545 ปัจจุบันรับราชการตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้