กระบวนการผลิตเซลลูโลสโดยใช้การตรึงด้วย Static Cellulose Microfibril Attachment Matrix

CELLULOSE PRODUCTION PROCESS BY USING FIXING BY STATIC CELLULOSE MICROFIBRIL ATTACHMENT MATRIX

นิจวรรณ ผลงาม
NIJAWAN PHOLNGAM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-542-1

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กระบวนการผลิตเซลลูโลสโดยใช้การตรึงด้วย Static Cellulose Microfibril Attachment Matrix

CELLULOSE PRODUCTION PROCESS BY USING FIXING BY STATIC CELLULOSE MICROFIBRIL ATTACHMENT MATRIX

http://ebook.lib.kmitl.ac.th/library/book_detail/09024856

นิจวรรณ ผลงาม
NIJAWAN PHOLNGAM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-542-1

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 49644
วัน, เดือน, ปี 25 ก.พ. 2547

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

CELLULOSE PRODUCTION PROCESS BY USING FIXING BY STATIC CELLULOSE MICROFIBRIL ATTACHMENT MATRIX

NIJAWAN PHOLNGAM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2003

ISBN 974-324-542-1

COPYRIGHT 2003
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ กระบวนการผลิตเซลลูโลสโดยใช้การตรึงด้วย Static Cellulose Microfibril Attachment Matrix

CELLULOSE PRODUCTION PROCESS BY USING FIXING BY STATIC CELLULOSE MICROFIBRIL ATTACHMENT MATRIX

ชื่อนักศึกษา นางสาวนิจวรรณ ผลงาม

รหัสประจำตัว 42066009

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การอาหาร

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.ปราโมทย์ ศิริโรจน์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.วราวุฒิ	ครูส่ง	
ดร.ปราโมทย์	ศิริโรจน์	
ผศ.เยาวลักษณ์	สุรพันธพิศิษฐ์	
ดร.ศศิวิมล	ชื่นอิ่ม อาเหม็ด	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 9 พฤษภาคม 2546 เวลา 10.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง D213 อาคารเจ้าคุณทหาร

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.บุญวัฒน์ อัตชู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 29 **เดือน** พฤษภาคม **พ.ศ.** 2546

หัวข้อวิทยานิพนธ์	กระบวนการผลิตเซลลูโลสโดยใช้การตรึงด้วย Static Cellulose Microfibril Attachment Matrix
นักศึกษา	นางสาวนิจวรรณ ผลงาม
รหัสประจำตัว	42066009
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การอาหาร
พ.ศ.	2546
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. วราวุฒิ ครูส่ง
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. ปราโมทย์ ศิริโรจน์

บทคัดย่อ

การพัฒนากระบวนการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift โดยใช้กระบวนการหมักแบบ SCMA matrix process ซึ่งเป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยเชื้อจะยึดเกาะบน SCMA matrix พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณเซลลูโลสมากกว่าวิธีการหมักแบบปกติ

จากการศึกษาพบว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการหมักคือ 1.5 vvm และวัสดุที่ใช้เป็น SCMA matrix ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ *A. xylinum* DK ที่ให้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุดคือ ตำแหน่งที่สูงจากท่อให้อากาศ 1 นิ้ว และจำนวนชั้นของ SCMA matrix เท่ากับ 3 ชั้น และมีระยะห่างระหว่างชั้นเท่ากับ 2 นิ้ว ซึ่งเป็นลักษณะของ SCMA matrix ที่ใช้ในการตรึงเซลล์แล้วให้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุดเท่ากับ 2.27 g dry wt/L ที่ระยะเวลาการหมัก 7 วันและอุณหภูมิ 30 °ซ

ในการหมักแบบ Repeated Batch โดยการตรึงเซลล์ด้วย SCMA matrix ให้ปริมาณเซลลูโลสเท่ากับการหมักแบบ Batch ที่ใช้หัวเชื้อในการหมัก 10 เปอร์เซ็นต์ การขยายขนาดการผลิตในถังหมักแบบ airlift ที่ปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร โดยวิธีหมักแบบ Repeated Batch พบว่าปริมาณเซลลูโลสที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในถังหมักที่มีปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตรแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังนั้นวิธีการตรึงเซลล์ด้วย SCMA matrix จึงสามารถขยายขนาดการหมักได้โดยมีผลกระทบต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK น้อย

Thesis Title	Cellulose Production Process by Using Fixing by Static Cellulose Microfibril Attachment Matrix
Student	Miss Nijawan Pholngam
Student ID.	42066009
Degree	Master of Science
Programme	Food Science
Year	2003
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Warawut Krusong
Thesis Co-Advisor	Dr. Pramote Sirirote

ABSTRACT

Bacterial cellulose production process by *A. xylinum* DK in airlift fermentor was developed. The SCMA matrix process was conducted by fixing *A. xylinum* DK cells on SCMA matrix. The increase of cellulose content was obtained.

It was found that for a both fermentation with 1.5 L working volume, the most appropriate condition that yielded the highest cellulose content was at aeration rate of 1.5 vvm and cotton was used as SCMA matrix. The best position of SCMA matrix was 1 inch above air sparger. The use of three cotton SCMA matrix with 2 inches space between enchother provided the highest cellulose content of 2.27 g dry wt/L after fermentation time of 7 days at 30 °C

The repeated batch fermentation using SCMA matrix process as above was investigated. The fixing cell on SCMA matrix from the first batch was used as the starter for the second batch continuously. The recent showed that non-significant difference of cellulose content was obtained when compared with the previous batch fermentation methods.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดี ด้วยคำแนะนำและคำปรึกษาจาก รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ และ ดร. ปราโมทย์ ศิริโรจน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ทำวิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ และ ดร. ศศิวิมล ชื่นอิ่มอาเหม็ด ที่ได้ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งช่วยให้คำแนะนำตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณมารดา พี่ ๆ เพื่อน ๆ ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำ ตลอดทั้งให้กำลังใจในงานวิจัยครั้งนี้มาโดยตลอด

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นิจวรรณ ผลงาม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญภาพ.....IX

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 ขอบเขตการวิจัย.....1

1.3 วัตถุประสงค์.....1

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 แบคทีเรียเซลลูโลส (Bacterial Cellulose).....3

2.2.1 สมบัติของแบคทีเรียเซลลูโลส.....3

2.2 เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*.....4

2.2.1 การสังเคราะห์เซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum*.....6

2.3 เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* DK.....7

2.4 เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง (immobilized cells).....10

2.4.1 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธีการใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงกับวิธีอื่น ๆ.10

2.4.2 วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์.....11

2.5 การพัฒนากระบวนการผลิตเซลลูโลส.....11

2.5.1 การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในถังหมักแบบ airlift.....13

2.5.2 ลักษณะของแบคทีเรียเซลลูโลสในถังหมักแบบ airlift.....16

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 ปัจจัยในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส....16
2.6.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* 16
2.6.2 ความเป็นกรดด่าง....17
2.6.3 ออกซิเจน....17
2.6.4 แหล่งคาร์บอน....18
2.6. แหล่งไนโตรเจน....19
2.6.3 อุณหภูมิ....19
2.7 จุลินทรีย์ปนเปื้อนในกระบวนการหมักวุ้นเซลลูโลส....19
2.8 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว....20
2.8.1 กากน้ำตาล....20
2.8.2 น้ำหางนม....20
2.8.3 น้ำกะทิ....21
2.8.1 น้ำมะพร้าว....22
2.9 วัสดุที่เชื้อยึดเกาะ....23
2.9.1 ฝ้าย....23
2.8.1 บวบ....25
2.8.1 พลาสติก....26
2.10 มุมมองในอนาคตของแบคทีเรียเซลลูโลส....28

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ....29
3.1 วัตถุดิบ....29
3.2 เชื้อจุลินทรีย์....29
3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก....29
3.4 เครื่องมือที่ใช้ในการผลิต....29
3.5 สารเคมี สารอาหาร....30

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.6 สถานที่ดำเนินงาน.....30
3.7 วิธีการดำเนินงาน.....31
3.7.1 การศึกษาอัตราการให้อากาศ (aeration rate).....31
3.7.2 การคัดเลือก SCMA matrix.....31
3.7.3 ปัจจัยในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK โดยใช้ SCMA matrix ที่เหมาะสม.....32
3.7.4 ศึกษาการใช้ SCMA matrix ในการตรึงเซลล์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักในลักษณะ Repeated Batch.....33
3.7.5 ศึกษาการขยายขนาดการหมักเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในลักษณะ Repeated Batch.....33

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....34
4.1 ผลการศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม.....35
4.2 ผลการคัดเลือก SCMA matrix.....39
4.3 ผลการศึกษาปัจจัยในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum* DK โดยใช้ SCMA matrix ที่เหมาะสม.....43
4.4 ผลการใช้ SCMA matrix ในการตรึงเซลล์เพื่อเป็นหัวเชื้อในการหมักในลักษณะ Repeated Batch.....49
4.5 ผลการศึกษาการขยายขนาดการหมักเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* DK.....55

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....55

บรรณานุกรม.....64

ภาคผนวก.....70

ประวัติผู้เขียน.....79

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 เปรียบเทียบการเจริญของโคโลนีบนอาหารและในอาหารเลี้ยงเชื้อของโคโลนีของ *A. xylinum* DK หลังจาก 7 และ 14 วัน ที่ 32 °ซ.....8

2.2 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตจาก *A. xylinum* DK ในการเลี้ยงด้วยสูตรอาหารต่าง ๆ 9

2.3 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของเส้นใยฝ้ายจากการทดลองของกระทรวงเกษตร สหรัฐอเมริกา เมื่อความชื้นของฝ้าย 8%.....25

4.1 ผลของอัตราการให้อากาศ (aeration rate) ต่อปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ ในการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วันที่อุณหภูมิห้อง... 35

4.2 ผลของการใช้ผ้าฝ้าย ใยบวบ และพลาสติก เป็น SCMA matrix ต่อปริมาณเซลลูโลสและ ปริมาณเซลล์ ในการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง.....40

4.3 ผลของการวางตำแหน่งของ SCMA matrix ที่ระดับความสูงจากท่อให้อากาศต่างกัน ต่อปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ ในการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* DKในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง..... 44

4.4 ผลของจำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้นของ SCMA matrix ต่อปริมาณเซลลูโลส และปริมาณเซลล์ ในการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* DKในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง.....46

4.5 ผลของการหมักแบบ Repeated Batch โดยใช้เชื้อที่ถูกตรึงในการหมักรอบแรกเป็นหัวเชื้อสำหรับ การหมักรอบต่อไป ต่อปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ที่มีปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 15 วัน จำนวนทั้งหมด 3 รอบ รอบละ 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง.....50

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.6 ผลของการหมักแบบ Repeated Batch โดยใช้เชื้อที่ถูกตรึงในการหมักรอบแรกเป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักรอบต่อไป ต่อปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ที่มีปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร เป็นระยะเวลา 15 วัน จำนวนทั้งหมด 3 รอบ รอบละ 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง.....53

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 แบคทีเรียเซลลูโลสและเซลลูโลสจากพืช....4
2.2 วิถีการเปลี่ยนแปลงกลูโคสของเชื้อ *Acetobacter xylinum*....7
2.3 รูปแบบการตรึงเซลล์หรือเอนไซม์....11
2.4 Microaerophilic carrier ในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum*....12
2.5 รูปแบบของ SCMA matrix ในการสร้างเซลลูโลสของ *A. xylinum* DK....13
4.1 ผลของอากาศที่ระดับอัตราการให้อากาศ 0.1-2.0 vvm ในการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift เป็นระยะเวลา 7 วันที่อุณหภูมิห้อง ต่อการเปลี่ยนแปลงของ ค่า DO น้ำตาลรีดิวซ์ ค่า pH จำนวนเซลล์ในน้ำหมัก 36
4.2 ผลของ SCMA matrix ชนิดต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift เป็นระยะเวลา 7 วันที่อุณหภูมิห้อง ต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า DO น้ำตาลรีดิวซ์ ค่า pH จำนวนเซลล์ในน้ำหมัก ปริมาณเซลลูโลส และปริมาณเซลล์....41
4.3 ผลของระดับความสูงในการวางตำแหน่งของ SCMA matrix ในการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift เป็นระยะเวลา 7 วันที่อุณหภูมิ 30 °ซ ต่อการเปลี่ยนแปลงของ ค่า DO น้ำตาลรีดิวซ์ ค่า pH จำนวนเซลล์ 52
4.4 ผลของจำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้น ของ SCMA matrix ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า DO น้ำตาลรีดิวซ์ ค่า pH จำนวนเซลล์ในน้ำหมัก ...48
4.5 ความสัมพันธ์ของเชื้อ *A. xylinum* DK ที่เจริญอยู่ในน้ำหมัก (viable cell) น้ำตาลรีดิวซ์ ค่า DO และค่า pH ของการหมักแบบ Repeated Batch โดยใช้เชื้อที่ถูกตรึงในการหมักรอบแรก เป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักรอบต่อไปของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร จำนวนทั้งหมด 3 รอบ รอบละ 5 วัน เป็นระยะเวลาทั้งหมด 15 วัน ที่อุณหภูมิห้อง 51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.6 ความสัมพันธ์ของเชื้อ *A. xylinum* DK ที่เจริญอยู่ในน้ำหมัก (viable cell) น้ำตาลรีดิวซ์ ค่า DO และค่า pH ของการหมักแบบ Repeated Batch โดยใช้เชื้อที่ถูกตรึงในการหมักรอบแรกเป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักรอบต่อไปของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร จำนวนทั้งหมด 3 รอบ รอบละ 5 วัน เป็นระยะเวลาทั้งหมด 15 วัน ที่อุณหภูมิห้อง 51

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันเซลลูโลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* ได้นำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น สารให้ความคงตัว สารให้ความหนืด ยา อาหารเสริมสุขภาพ (healthy food) โดยใช้ในการเพิ่มเยื่อใยหรือกากอาหาร รับประทานเป็นอาหารหวาน เช่น วุ้นน้ำมะพร้าวในน้ำเชื่อม นอกจากนี้ยังมีการนำผลิตภัณฑ์วุ้นน้ำมะพร้าวที่ได้มาผสมกับน้ำผลไม้ เช่น น้ำลิ้นจี่ (เชิดชัย ตั้งอมรสุขสันต์ และวราวุฒิ ครูส่ง. 2536) และยังมีความเหมาะสมในการผลิตกระดาษคุณภาพสูง เช่น กระดาษลำโพง กระดาษคาร์บอน เนื่องจากเชื้อ *A. xylinum* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ดีในกระบวนการหมักแบบอาหารเหลวและมีการให้อากาศในปริมาณที่เหมาะสม ลักษณะที่เชื้อผลิตออกมานั้นจะเป็นเส้นใยที่สานกันเป็นร่างแหพันกันอย่างแน่นหนา มีความยืดหยุ่นสูง ความเหนียวนุ่ม ความใส มีการดูดซับและความบริสุทธิ์สูง เซลลูโลสที่แบคทีเรียผลิตได้เรียกอีกอย่างว่าวุ้นน้ำส้มหรือวุ้นน้ำมะพร้าว เนื่องจากวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตวุ้น คือ น้ำมะพร้าว

การผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวในปัจจุบันเป็นการผลิตในระบบอุตสาหกรรมต้องผลิตในปริมาณมาก ซึ่งเป็นการผลิตแบบการหมักผิวนิ่ง ได้มีการศึกษาถึงวิธีพัฒนากระบวนการหมัก ในสภาวะที่มีการให้อากาศ (aerated condition) ในถังหมักแบบ airlift เป็นอีกแนวทางหนึ่งของการผลิตซึ่งจะได้เซลลูโลสที่มีสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างออกไปจากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการกวนและสภาวะผิวนิ่ง (Chao *et al.* 1999) เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆต่อไป

1.2 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตรึงเซลล์แบคทีเรีย *A. xylinum* DK บน SCMA matrix ชนิดต่างๆ ในการหมักแบบ airlift เพื่อศึกษาหาชนิดของ SCMA matrix ที่ดีที่สุด

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาพารามิเตอร์ที่เกี่ยวกับการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ในสภาวะที่ตรึงเซลล์ด้วยกระบวนการ Static Cellulose Microfibril Attachment Matrix Process

2. เพื่อศึกษาแนวทางในการใช้ Static Cellulose Microfibril Attachment Matrix สำหรับตรึงเซลล์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ *A. xylinum* DK ในการหมัก

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ผลของงานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงปัจจัยหรือพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิตเซลลูโลสในถังหมักแบบ airlift ในกระบวนการผลิตที่ใช้ SCMA matrix ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วโดยเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK และสภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้ SCMA matrix ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์หรือเป็นแนวทางในการผลิตเซลลูโลสในกระบวนการหมักในถังหมักแบบ airlift ต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียเซลลูโลส (Bacterial Cellulose)

เซลลูโลสที่ได้จากการหมักจากเชื้อแบคทีเรียมีชื่อเรียกหลายอย่างด้วยกัน เช่น วุ้นสวรรค์ วุ้นน้ำมะพร้าว วุ้นน้ำส้ม เห็ดรัสเซีย ลูกพร้าว หรือที่เรียกกันทั่วไปว่าแบคทีเรียเซลลูโลส (bacterial cellulose) หรือไบโอเซลลูโลส (biocellulose) (Production of biocellulose (bacterial cellulose). n.d.) [Internet, A] ซึ่งเป็นผลผลิตจากการหมักน้ำมะพร้าวด้วยเชื้อแบคทีเรียจำพวกเดียวกันกับแบคทีเรียที่สร้างกรดน้ำส้ม โดยธรรมชาติเชื้อที่สร้างกรดน้ำส้มจะรวมตัวกันอยู่บนผิวหน้าของอาหารเหลวที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบ เกิดเป็นแผ่นวุ้นบางๆ ลอยอยู่บนผิวหน้าเมื่อหมักน้ำส้มสายชูในสภาพนิ่ง (static fermentation) วุ้นดังกล่าวเรียกว่า mother of vinegar เกิดจากแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Acetobacter aceti* แต่แบคทีเรียที่ใช้หมักเซลลูโลสเป็นเชื้อ *A. xylinum* เนื่องจากเชื้อนี้ไม่เหมาะที่จะสร้างกรดน้ำส้มเพราะเชื้อจะสร้างวุ้นมากเกินไปทำให้อุดตันทางเดินของน้ำส้มสายชู จึงนำลักษณะเด่นของเชื้อนี้มาใช้เพื่อผลิตแผ่นเซลลูโลส (สุเมธ ตันตระเธียร. 2537)

ชาวฟิลิปปินส์ได้นำเชื้อ *A. xylinum* มาใช้หมักน้ำผลไม้จนได้วุ้นที่เป็นแผ่นเซลลูโลสโดยสังเกตว่าเมื่อตั้งน้ำผลไม้หรือน้ำมะพร้าวทิ้งไว้จะเกิดแผ่นที่เป็นเยื่อเหนียวมีลักษณะพิเศษที่เป็น cartilaginous substance และเรียกวุ้นนี้ว่า nata de coco ซึ่งเป็นที่นิยมรับประทานและยังผลิตกันแพร่หลายทั่วไป ตลอดจนส่งออกขายยังต่างประเทศด้วย (สุเมธ ตันตระเธียร. 2537)

ปัจจุบันนิยมใช้เชื้อ *A. xylinum* เป็นเชื้อสำหรับผลิตวุ้นมะพร้าวเนื่องจากสามารถเจริญได้ง่ายสร้างวุ้นได้รวดเร็วกว่าเชื้อตัวอื่นโดยใช้น้ำมะพร้าวซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้เป็นวัตถุดิบ

2.1.1 สมบัติของแบคทีเรียเซลลูโลส

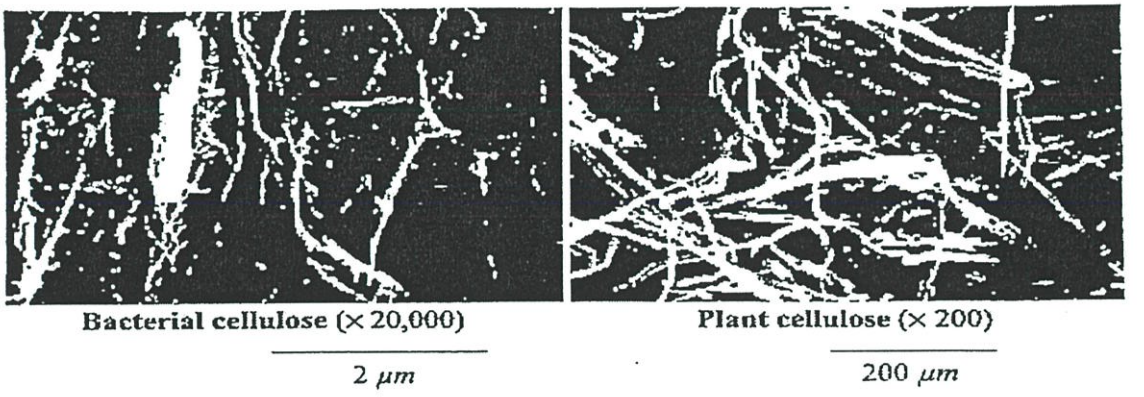
แบคทีเรียเซลลูโลสหรือไบโอเซลลูโลส (biocellulose) เป็นเซลลูโลสที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียที่มีโครงสร้างทางเคมีเหมือนเซลลูโลสจากพืชแต่แตกต่างกันทางคุณสมบัติด้านกายภาพและเคมี แบคทีเรียเซลลูโลสจัดเป็นโฮโมโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นเส้นสายด้วยพันธะเบต้า 1-4 กลูโคซิดิก (β-1,4 glucosidic bond) และในระหว่างเส้นสายต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียเซลลูโลสเล็กกว่าเซลลูโลสจากพืช 100 เท่า ดังแสดงในภาพที่ 2.1 และมีค่า Young's modulus ที่แสดงถึงความแข็งแรง (strong) ของเส้นใย

เหมือนกับอะลูมิเนียมเป็นที่คาดว่าแบคทีเรียเซลลูโลสจะเป็น biodegradable biopolymer ตัวใหม่ (Production of biocellulose (bacterial cellulose). n.d.) [Internet, A]

แบคทีเรียเซลลูโลสจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มมีลักษณะคล้ายแผ่นวุ้นสีขาว เรียกว่า gelatinous membrane หรือ pellicle โดยจัดอยู่ในรูปโครงสร้างที่ไม่ละลายน้ำโดยมีคุณสมบัติพิเศษหลายอย่าง เช่น ชอบน้ำ ย้อมติดสีได้ดี (dyability) และคงทนต่อการฉีกขาดได้สูง (high shear strength)

แบคทีเรียเซลลูโลสจาก *A. xylinum* มีคุณสมบัติพิเศษคือมีความบริสุทธิ์สูง (high purity) ultra-fine fiber network, high crystallinity (Research Field : Development of Function Polysaccharides. n.d.) [Internet, B]

แบคทีเรียเซลลูโลสจัดเป็นอาหารในกลุ่มเส้นใย (dietary fibers) โดยจัดอยู่ในกลุ่มอาหารเส้นใยที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharide, NSP) โดยอาหาร NSP มีคุณสมบัติในการเป็นอาหารเสริมสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคท้องผูก โรคอ้วน โรคหัวใจ โรคเบาหวาน มะเร็งลำไส้ และมีข้อแนะนำให้รับประทานประมาณ 18 กรัมต่อวัน (โครงการเผยแพร่ความรู้และผลงานทางวิชาการผ่านสื่อหนังสือพิมพ์. 2544)



ภาพที่ 2.1 แบคทีเรียเซลลูโลสและเซลลูโลสจากพืช

ที่มา : Production of biocellulose (bacterial cellulose). (n.d.) [Internet, A]

2.2 เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*

เชื้อ *A. xylinum* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม acetic acid bacteria แกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีขนาดประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน เป็นเชื้อที่สามารถสร้างกรดได้ เซลล์อาจอยู่เป็นเส้นสาย เป็นสายเดี่ยวหรือเป็นคู่ ไม่พบการสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) และสร้างเซลลูโลสได้เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ต้องการอากาศในการเจริญ (obligate aerobe) สร้างเอนไซม์ catalase ไม่สร้างสี แต่จะสร้างวุ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาล

สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดสำหรับการเจริญ ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทหรือย่อยเจลาติน นอกจากนั้นยังไม่สร้าง indole และ hydrogen sulfide ไม่สามารถย่อยแป้งเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนได้ น้ำตาลที่เชื้อสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้มีหลายอย่าง เช่น กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส เอธิลีนไกลคอล กลีเซอรอล มอลโตส แลคโตส และแมนนิทอล โดยสามารถใช้ acetate และ lactate เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ด้วยโดยจะออกซิไดส์กรดทั้งสองเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (สุเมธ ตันตระเธียร. 2537)

Scott and Cannon (1989) พบว่า *A. xylinum* สามารถเจริญในสภาวะ microaerophilically ได้ โดยเซลลูโลสที่เชื้อสร้างจะทำให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ได้รับอากาศ และทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายจากแสงยูวีรวมทั้งช่วยป้องกันเซลล์และต่อสู้กับเชื้อชนิดอื่น แต่ในธรรมชาติเซลลูโลสมีหน้าที่หลายอย่างขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เชื้อเจริญอยู่

ในการสังเคราะห์เซลลูโลส เชื้อ *A. xylinum* จะสร้างเส้นใยเล็ก ๆ (microfibrils) และขับออกมาภายนอกเซลล์เส้นใยเล็ก ๆ เหล่านี้จะต่อกันเป็นสายยาวโดยความกว้างของเส้นใยนี้ประมาณ 3.2 x 1.33 นาโนเมตร ส่วนความยาวแปรตามระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก อัตราการเจริญของเส้นใยนี้ประมาณ 2 นาโนเมตรต่อนาที เส้นใยเซลลูโลสที่ *A. xylinum* ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์จะต่อกันเป็นเส้นสายยาวและเมื่อเส้นใยของเซลลูโลสนี้มีจำนวนมากขึ้นเส้นสายเหล่านี้จะทำหน้าที่ล้อมรอบและหุ้มตัวเซลล์ของ *A. xylinum* ไว้ภายใน

เชื้อ *A. xylinum* จะสร้างเส้นสายเซลลูโลสออกมาจนกระทั่งเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นเชื้อจะถูกล้อมรอบด้วยเส้นสายเซลลูโลส เมื่อสายเซลลูโลสมีปริมาณมากจะรวมตัวกันเป็นแผ่นหนา มีสีขาวขุ่น เกิดเป็นแผ่นเซลลูโลส ลอยอยู่บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการสร้างเซลลูโลสเท่ากับ 2 ไมโครเมตรต่อนาที (Watanabe and Yamanaka.1995)

ในปัจจุบันเลือกใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากมีราคาถูกและหาได้ง่ายโดยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถใช้ซูโครสได้ (Verschuren *et al.* 2000)

$$\text{Sucrose} + 12O_2 \longrightarrow 12\,CO_2 + 12H_2O$$

$$\text{Sucrose} \longrightarrow \text{Cellulose}$$

สารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. xylinum* ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญ โดยเชื้อสามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้น (synthetic medium) จะต้องการยีสต์สกัด (yeast extract) เปปโตน (peptone) สำหรับการเจริญ แต่เมื่อเลี้ยง

ในอาหารที่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำผลไม้ต่าง ๆ น้ำมะพร้าว เชื้อไม่ต้องการสารอาหารเหล่านี้เพื่อการเจริญเติบโตทั้งนี้เนื่องจากในอาหารที่มาจากธรรมชาติมีสารเพื่อการเจริญอยู่อย่างเพียงพอ (สุเมธ ตันตระเธียร. 2537) และพบว่าการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* ขึ้นกับการเจริญของเชื้อ เมื่อเชื้อเจริญได้ดีและมีปริมาณมากขึ้นก็จะสามารถสร้างเซลลูโลสได้เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (Ishikawa *et al.* 1995 ; Kouda *et al.* 1998)

การเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งจะมีลักษณะต่างกันออกไป บางสายพันธุ์อาจสร้างโคโลนีที่มีลักษณะเป็นทรงกลม ผิวเรียบ ซึ่งเมื่อทิ้งไว้นานขึ้น จะมีผิวขรุขระหรือมีรอยย่น โคโลนีอาจมีขนาดใหญ่หรือเล็กขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

2.2.1 การสังเคราะห์เซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum*

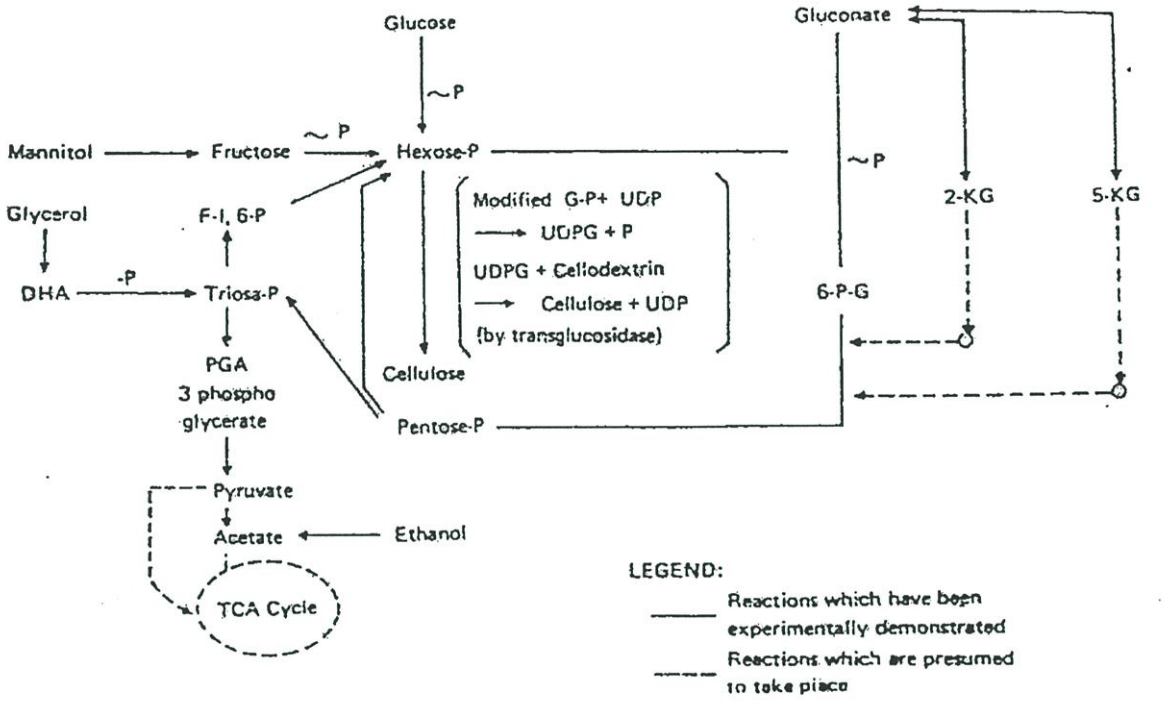
การสังเคราะห์เซลลูโลสของ *A. xylinum* มีความคล้ายคลึงกันทั้งทางเคมีและกลไกการสร้างเซลลูโลสของพืช ในระหว่างการสร้างเซลลูโลสเซลล์ของ *A. xylinum* ต้องอยู่ในสภาพที่มีอากาศและแหล่งคาร์บอนเพื่อสานต่อโครงสร้างของเซลลูโลส ในปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชันของการสร้างเซลลูโลสโดย *A. xylinum* มีสารตั้งต้นคือ Uridine diphosphoglucose (UDPG) โดยที่ปฏิกิริยาเกิดดังสมการ

$$\text{Uridine diphosphoglucose} + (\text{glucose})_n \longrightarrow \text{Uridine diphosphogdlucose} + (\text{glucose})_{n+1}$$

วิถีการเปลี่ยนแปลงกลูโคสของ *A. xylinum* คือ เซลล์จะสร้างเซลลูโลสจากน้ำตาลเฮกโซสโดยเข้าวงจรเพนโตสทางเดียวกับเฮกโซสฟอสเฟต ในการสังเคราะห์เซลลูโลสนอกจากใช้กลูโคสเป็นวัตถุดิบได้แล้วยังสามารถใช้กลูโคเนท (gluconate 2-O-Gn , 5-O-Gn) หรือวัตถุดิบที่องค์ประกอบเป็น 3 คาร์บอน เช่น กลีเซอรอล หรือฟรุกโตสได้อีกด้วย กลูโคสที่อยู่ในเซลล์จะเปลี่ยนเป็นกลูโคเนทอย่างรวดเร็ว และมีบางส่วนเปลี่ยนต่อไปเป็น 2-O-Gn หรือ 5-O-Gn และอาจเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งอาจเข้าร่วมในปฏิกิริยาต่อก็ได้ สำหรับไพรูเวท (pyruvate) และอะซีเตท (acetate) รวมทั้งสารตัวกลางในวงจรซิเตรทจะถูกเซลล์ออกซิไดส์จนได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์แต่คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำจะไม่มีส่วนเกี่ยวข้องในการสร้างเซลลูโลส

วัตถุดิบที่แบคทีเรียใช้ในการสร้างเซลลูโลสได้นั้นจำเป็นต้องสามารถเข้าสู่วงจรเพนโตสได้ วงจรเพนโตสที่แสดงนี้เป็นเพียงทางเข้าสู่วงจรทางหนึ่ง ซึ่งในความเป็นจริงแล้วยังมีอีกหลายทางที่จะเข้าสู่วงจรนี้ได้ดังเช่นวิถีที่ต้องใช้เอนไซม์กลูโคไคเนส (glucokinase) หรือวิถีที่อาศัยการเปลี่ยนกลูโคส

เป็นกลูโคเนทก่อนจากนั้นกลูโคเนทนี้จะสามารถเข้าสู่วงจรเพนโตสได้สองทาง คือ การเข้าโดยตรงซึ่งต้องใช้เอนไซม์กลูโคไคเนส และการเข้าทางอ้อมโดยผ่านทาง 2 และ 5-O-Gn ตามลำดับ



ภาพที่ 2.2 วิถีการเปลี่ยนแปลงกลูโคสของเชื้อ *Acetobacter xylinum*

ที่มา : Hestrin and Schramm (1954)

2.3 เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* DK

Krusong *et al.* (2001a) ได้รายงานลักษณะของเชื้อ *A. xylinum* DK ไว้ดังนี้

เชื้อ *A. xylinum* DK เป็นแบคทีเรียที่สร้างเซลลูโลสและเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสำหรับการเลี้ยงในสภาวะที่ใช้การกวนโดยแยกได้จากสับปะรดสุก ที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในเมืองไทย ทำการเก็บรักษาเชื้อโดยเลี้ยงในอาหาร 5 มิลลิลิตรแล้วเขย่า 3 วัน เก็บในอุณหภูมิ 4 °ซ เป็น stock culture

หลังจากที่เก็บรักษาในสภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 1 ปี พบว่าสามารถแยกโคโลนีจากชนิดเดียวได้เป็น 2 ชนิด ชนิดแรกเรียกว่า LC type (Large colony type) มีลักษณะเป็นโคโลนีใหญ่ ขุ่น ผิวเรียบ สีครีม อีกชนิดหนึ่งเรียกว่า SC type (Small colony type) เป็นโคโลนีขนาดเล็ก ใส เรียบ สีครีม เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง (agar slant) พบว่า LC type เจริญได้เร็วกว่า SC type

A. xylinum เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็น strictly aerobic microorganism แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะ microaerophilic condition เช่นกัน ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถใช้อธิบายลักษณะของเซลลูโลสที่ *A. xylinum* สร้าง พบว่าแผ่นเซลลูโลส (cellulose pellicle) ที่เชื้อสร้าง มีความเหนียวเพิ่มมากขึ้นจากผิวหน้าสู่ด้านล่างของอาหาร ในสภาวะการเลี้ยงแบบผิวนิ่ง (static fermentation) ซึ่งเซลลูโลสที่เชื้อ *A. xylinum* DK สร้างก็มีลักษณะดังที่กล่าวมาแล้วเช่นกัน เพื่อที่จะทดสอบการเจริญในสภาวะ microaerophilic ของ LC type และ SC type ของ *A. xylinum* DK ได้ทำการ pour plate technique พบว่าโคโลนี้ทั้งสองชนิดสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 7 วันและสามารถเจริญภายในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 7-14 วัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ในการศึกษาการเปรียบเทียบการสร้างเซลลูโลสของโคโลนีแต่ละชนิดของ *A. xylinum* DK ได้ทำการหมัก 3 สภาวะ สภาวะผิวนิ่ง สภาวะเขย่า สภาวะที่ใช้การกวน เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเซลลูโลสของทั้ง LC type และ SC type การหมักในสภาวะวางนิ่งพบว่า LC type สร้าง cellulose pellicle หนากว่า SC type ในขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะเขย่าปริมาณเซลลูโลสไม่ต่างกัน สำหรับการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการกวน 100 rpm ในถังหมัก CSTR ปริมาณเซลลูโลสที่ได้ไม่ต่างกัน ถึงแม้ว่าปริมาณเซลลูโลส (cellulose content) และปริมาณเซลล์ (cell content) ชนิด LC type มากกว่า SC type แต่ไม่ต่างกันในทางสถิติ

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบการเจริญของโคโลนีบนอาหารและในอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK หลังจาก 7 และ 14 วัน ที่ 32 °ซ

Type of colony of *A. xylinum* DK	Colony forming ability Incubation time 7 days Surface	7 days Inside	14 days Surface	14 days Inside
Large colony (LC type)	+	-	+	+
Small colony (SC type)	+	-	+	+

(+) = Growth; (-) = No growth; Surface = Surface growth on agar medium; Inside = Inside growth in agar medium.

ที่มา : Kursong *et al.* (2001a)

จากผลการทดลองของ Krusong *et al.* (2001a)พบว่าโคโลนีทั้งสองชนิดของ *A. xylinum* DK มีความสามารถในการสร้างเซลลูโลสและเซลล์ไม่ต่างกัน เมื่อนำไปส่องด้วยกล้อง scaning electron microscope พบว่า LC type ตัวเซลล์ยาวกว่า SC type ซึ่งจะมีลักษณะเซลล์ที่เล็กกว่าแต่จริง ๆ แล้วขนาดแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

จากการทดลองที่ผ่านมาในการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* DK พบว่า SC type สามารถที่จะพัฒนาเป็น LC type ได้และ LC type ก็สามารถเปลี่ยนกลับมาเป็น SC type ได้เช่นกัน

ลำพึง พุ่มจันทร์ (2545) ได้ศึกษาการเจริญของ *A. xylinum* DK ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียเซลลูโลส เพื่อใช้ศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลส โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตจาก *A. xylinum* DK ในการเลี้ยงด้วยสูตรอาหารต่าง ๆ (ปริมาตร 500 มล.)

สูตรอาหาร	ปริมาณเซลลูโลสน้ำหนักแห้ง (กรัม)
Coconut water	0.8635
Hestrin & Schramm (BSH medium)(1954)	0.3854
Alaban (1962)	0.1878
Forang (1989)	0.1876
Oikayama (1992)	0.2272

ที่มา : ลำพึง พุ่มจันทร์ (2545)

ผลการศึกษาพบว่าอาหารสูตร Hestrin & Schramm (1954) เป็นสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เนื่องจากเชื้อสามารถใช้อาหารในการสร้างเซลลูโลสและผลิตเซลลูโลสได้สูงสุดในจำนวนอาหารสังเคราะห์ทั้ง 4 สูตรด้วยกัน ซึ่งเป็นที่ทราบทั่วไปว่าเหมาะสมในการใช้ผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส (Hestrin and Schramm. 1954) ส่วน coconut water ให้ผลผลิตปริมาณเซลลูโลสที่สูงกว่าอาหารสูตร Hestrin and Schramm เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารจากธรรมชาติซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Toyosaki *et al.* (1995) ที่พบว่าการผลิตเซลลูโลสของเชื้อจะขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเซลลูโลสให้ได้ปริมาณมาก

ในการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญและสร้างเซลลูโลสที่เหมาะสมของ *A. xylinum* DK ในการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่งในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาตรอาหาร BSH medium ที่ใช้ในการหมัก

100 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาการเจริญและการสร้างเซลลูโลสทั้งหมด 12 วัน ซึ่งจากการศึกษาพบว่าช่วงระยะเวลาวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 ของการหมักเชื้อมีการเจริญรวดเร็วและสามารถสร้างเซลลูโลสเป็นแผ่นวุ้นลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลวได้ปริมาณมากซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hestrin and Schramm (1954) และเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการที่จะนำไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น (starter) ในการทดลอง หลังจากวันที่ 7 ของการหมักพบว่าเชื้อมีการเจริญลดลง เนื่องจากปริมาณเซลล์ลดลงและเซลลูโลสที่สร้างขึ้นนั้นค่อนข้างคงที่ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลลูโลสในการทดลองนี้ในช่วงการหมักเป็นระยะเวลา 7 วัน

2.4 เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง (immobilized cells)

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง (immobilized cells) หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขตหรือให้อยู่ในบริเวณที่กำหนดโดยที่จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่งและสามารถนำมาใช้ได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์กำลังเจริญ เซลล์ระยะพักหรือเซลล์ที่ตายแล้ว เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดีคือมีความคงตัวสูงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก ทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้มาก แต่การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงก็มีข้อเสียคือเสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์และอาจสูญเสียความสามารถระหว่างการตรึงได้ นอกจากนี้อาจพบการปนเปื้อนของผลิตผลจากตัวเซลล์หรือสารที่ขับออกจากเซลล์ที่ถูกตรึงทั้งนี้ในกรณีที่เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเองเนื่องจากเซลล์ถูกใช้เป็นเวลานาน (บุษบา ยงสมิทธ์. 2540)

2.4.1 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธีการใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงกับวิธีอื่น ๆ

เซลล์ที่ถูกตรึงจัดเป็นตัวเร่งทางชีวเคมีชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ และมีข้อได้เปรียบหลายอย่างเมื่อเทียบกับตัวเร่งหรือวิธีอื่น ๆ คือ

2.4.1.1 ตัวเร่งทางเคมี

สามารถเร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะปกติและใช้พลังงานต่ำ ปฏิกิริยามีความจำเพาะและเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูง แต่มีข้อเสียคือ ต้องการปัจจัยร่วมต่าง ๆ ในการเกิดปฏิกิริยาและมีความคงตัวน้อยกว่าตัวเร่งทางเคมี

2.4.1.2 การหมัก

ในระหว่างการหมักการควบคุมการผลิตอย่างต่อเนื่องทำได้ยาก และหลังจากการหมักสิ้นสุดลงยังแยกผลผลิตที่ต้องการได้ยาก การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดีคือสามารถควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย

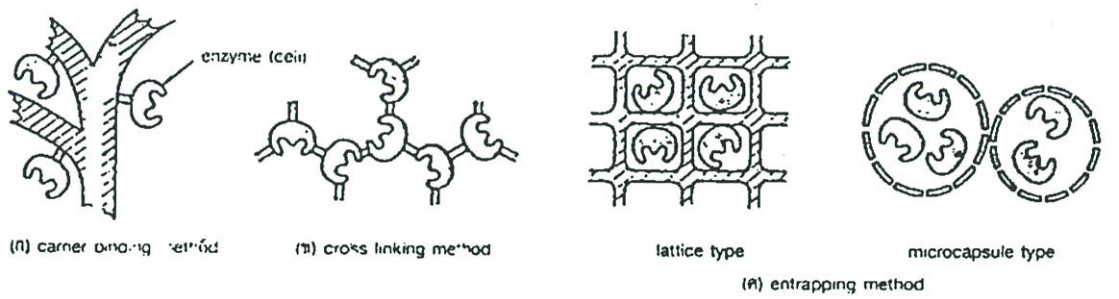
สะดวก ไม่มีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น สามารถแยกผลผลิตออกได้ง่าย เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงตัวสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก นอกจากนั้นเซลล์ที่ถูกตรึงในสภาพของเซลล์ระยะพักต้องการพลังงานเพื่อความอยู่รอดเท่านั้น เป็นการเพิ่มผลผลิตได้สูงกว่าการหมักโดยใช้เซลล์อิสระ

2.4.1.3 เซลล์อิสระ

เซลล์ที่ถูกตรึงได้เปรียบกว่าเซลล์อิสระ คือสามารถใช้เซลล์จำนวนมาก ๆ ได้ ศึกษาในถังปฏิกิริยาขนาดเล็กได้ ควบคุมปฏิกิริยาในการผลิตได้ง่ายและสามารถแยกผลิตผลออกได้สะดวก เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงตัวสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้มาก แต่การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงก็มีข้อเสียคือเสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์และอาจสูญเสียความสามารถระหว่างการตรึงได้ (บุษบา ยงสมิทธ์. 2540)

2.4.2 วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์มีวิธีคล้ายกับวิธีการตรึงเอนไซม์ แบ่งออกเป็น 3 วิธีหลักดังภาพที่ 2.3 ส่วนสารที่ใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ได้มีหลากหลาย เช่น ฟิล์มโพลีเอทิลีน เซรามิก อิฐ ไดอะตอม แอลจีเนต กลูเตน ฯลฯ (Willaert *et al.*1996 ; Bardi *et al.* 1997)



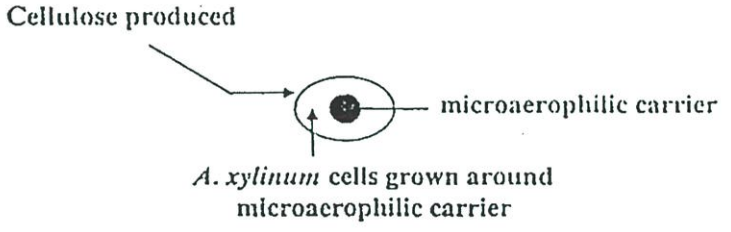
ภาพที่ 2.3 รูปแบบการตรึงเซลล์หรือเอนไซม์
ที่มา : Chibata (1978)

2.5 การพัฒนากระบวนการผลิตเซลลูโลส

Joris *et al.* (1993) รายงานการใช้สาร micro-particle เพื่อใช้เป็น microaerophilic carrier โดยได้ทำการศึกษาผลของความเร็วรอบของการเขย่าต่อการสร้างเซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum* พบว่าถ้าเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่าหรือการกวนจะส่งผลให้เกิด negative effect คือปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำที่มีมากขึ้นจะส่งผลให้เซลลูโลสที่สร้างจากเชื้อ *A. xylinum* มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 300 รอบ/นาที ปริมาณ

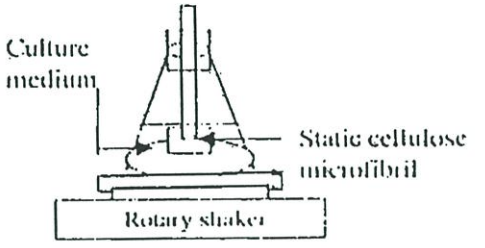
เซลลูโลสจะได้เพียง 50 % ของการเลี้ยงในสภาวะผิวนิ่ง อย่างไรก็ตามปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยการเติม micro-particle ลงในอาหารเหลว

Krusong *et al.* (1998b) ศึกษาการหมักใน CSTR โดยใช้เชื้อ *A. xylinum* DK ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้องการปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมในการเจริญและการสร้างเซลลูโลส ในการใช้ microaerophilic carrier เช่น Cellulose Porous Beads (CPBs) ซึ่งไม่เพียงแต่จะลดผลกระทบในทางลบ (negative effect) แต่ยังส่งเสริมการสร้างเซลลูโลสได้อีกด้วยภายใต้สภาวะการกวนใน CSTR และพบว่า cellulose powder (CP) ซึ่งเตรียมได้จากสายพันธุ์ DK สามารถใช้แทน CPBs ได้ โดยปริมาณเซลลูโลสแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ข้อดีของ CP คือมีราคาถูกกว่า CPBs และเป็น natural carrier จากการทดลองสังเกตได้ว่า *A. xylinum* DK ต้องการปริมาณออกซิเจน (dissolved oxygen) ต่ำ ทั้งในสภาวะที่เติมและไม่เติม microaerophilic carrier แต่ในการเจริญของเซลล์ยังต้องการออกซิเจนในปริมาณสูง (high dissolved oxygen) สังเกตได้จากกราฟการเจริญเป็น exponential growth ในวันแรกของการหมัก



ภาพที่ 2.4 Microaerophilic carrier ในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum*
ที่มา : Krusong *et al.* (1998b)

Krusong *et al.* (2001b) ได้พัฒนากระบวนการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* DK โดยใช้ static cellulose microfibril attachment (SCMA) matrix เป็นวัสดุให้เชื้อยึดเกาะในสภาวะเขย่า โดยเรียกกระบวนการนี้ว่า static cellulose microfibril attachment (SCMA) matrix process เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตเซลลูโลสต่อไป จากการทดลองพบว่า เชื้อ *A. xylinum* DK สามารถสร้างเส้นใย microfibril ได้เร็วกว่าการไม่ใช้ SCMA matrix ซึ่งใช้เปรียบเทียบกับตัวควบคุม และพบว่า Stainless steel screen มีความเหมาะสมที่สุดในการใช้เป็น SCMA matrix เชื้อจะสร้างเซลลูโลสรอบ ๆ matrix โดยลักษณะของเซลลูโลสที่เชื้อสร้างไม่มีลักษณะที่เป็นแผ่น (no pellet forming)



ภาพที่ 2.5 รูปแบบของ SCMA matrix ในการสร้างเซลลูโลสของ *A. xylinum* DK
ที่มา : Krusong *et al.* (2001b)

ณัฐพล ฟ้าภิญโญ (2542) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* DK ในสภาวะเขย่า สภาวะที่มีการให้อากาศในถังหมักแบบ airlift และถังหมักที่ใช้การกวน พบว่าความเร็วรอบของการเขย่าและอัตราการกวนที่ 100 รอบต่อนาที ได้ปริมาณเซลลูโลสสูงที่สุด การให้อากาศจากถังหมักแบบ airlift ให้ปริมาณเซลลูโลสต่ำกว่าการให้อากาศจากการกวน และการให้อากาศจากการกวนทำให้เกิด negative effect น้อยกว่าการให้อากาศจากถังหมักแบบ airlift

2.5.1 การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในถังหมักแบบ airlift

การออกแบบถังหมักแบบ airlift เกิดขึ้นเนื่องจากถังหมักแบบมีเครื่องกวนตามปกติจะต้องใช้อัตราการให้อากาศและการกวนสูงมาก ทำให้สิ้นเปลืองพลังงานและมีปัญหาการระบายความร้อนออกจากระบบ ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหานี้จึงได้มีการพัฒนาสร้างถังหมักแบบ airlift ซึ่งไม่มีการใช้ระบบใบพัดในการกวนขึ้นมา ถังหมักนี้มีท่อที่มีลักษณะเป็นท่อกลวง (draft tube) อยู่ข้างในถังหมักเมื่อปั๊มอากาศเข้าไปทางด้านล่างของถังหมักฟองอากาศนั้นจะดันไปตามท่อกลวงและกระจายทั่วถังหมัก ถังหมักลักษณะนี้ออกแบบมาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพร้อมทั้งช่วยลดพลังงาน (บุษบา ยงสมิทธ์. 2540)

หลักการทำงานของถังหมักแบบ airlift อาศัยความแตกต่างของความถ่วงจำเพาะของของเหลวเมื่อมีอากาศผสมอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน การส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่ของเหลวในถังหมักจะเกิดขึ้นเนื่องจากแรงดันของของเหลวภายในถังหมักโดยจะเกิดมากที่สุดที่บริเวณฐานของถังหมักและจะน้อยลงตามลำดับความสูงที่เพิ่มขึ้น ฟองอากาศที่กระจายตัวอยู่ในของเหลวจะทำให้ของเหลวมีความถ่วงจำเพาะลดลงและลอยสูงขึ้นจนกระทั่งถึงด้านบนของคอลัมน์ อากาศที่ละลายและกระจายตัวอยู่ในของเหลวก็จะถูกปลดปล่อยออกมาทำให้ของเหลวมีความหนาแน่นสูงขึ้นและตกลงสู่ส่วนล่างของถังหมัก อัตราการหมุนเวียนของของเหลวภายในถังหมักแบบ airlift จะขึ้นอยู่กับความสูงของคอลัมน์และอัตราการให้อากาศ (สมใจ ศิริโภค. 2537)

Airlift เป็นการหมักในสภาพอาหารเหลวโดยมีการให้อากาศทางด้านล่างของถังหมักและใช้อากาศเป็นการกวนซึ่งจะทำให้อากาศละลายในอาหารได้มากขึ้น ลักษณะรูปร่างของถังหมักมีได้หลายรูปแบบไม่จำกัดความสูงของถังหมักมีข้อดีคือสามารถใช้เลี้ยงเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ได้ เกิดแรงเฉือนต่ำประหยัดพลังงานและมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นต่ำ

เนื่องจากได้มีการใช้ถังหมักแบบ airlift ในการหมักอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เนื่องจากการหมักโดยถังหมักชนิดนี้ให้แรงเฉือนต่ำ การออกแบบถังหมักไม่ยากมีโครงสร้างของถังแบบง่าย ๆ ใช้พลังงานต่ำและได้ผลผลิตในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับถังหมักชนิดที่ใช้การกวน การปนเปื้อนจากเชื้ออื่นต่ำ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงได้มีการใช้ถังหมักแบบ airlift ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส

Chao *et al.* (1997) ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* ในถังหมักแบบ airlift โดยให้อากาศ 1 vvm ได้ปริมาณเซลลูโลส 2.3 g/L ในระยะเวลา 80 ชั่วโมง เมื่อให้อากาศที่เพิ่มออกซิเจนเข้าไป เซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 5.63 g/L ในระยะเวลา 28 ชั่วโมง พบว่าปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการสร้างเซลลูโลสและสามารถลดระยะเวลาการผลิตลงได้

Chao *et al.* (1999) ได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* subsp. *Sucrofermentans* BPR2001 ในถังหมักแบบ airlift ขนาด 50 ลิตรชนิดที่มี draft tube ใช้ปริมาตรการทำงาน 36 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Corn steep liquor-fructose (CSL-Fru medium) ใช้หัวเชื้อ 5 % พบว่าค่า DO (Dissolved oxygen) จะลดลงเข้าใกล้ศูนย์ภายในเวลา 8 ชั่วโมงจนตลอดเสร็จสิ้นการหมัก เมื่อระยะเวลาการหมักได้ 67 ชั่วโมงอัตราการผลิตเซลลูโลสของเชื้อเป็น 3.8 g/L เมื่อเชื้อได้รับอากาศเพิ่มมากขึ้นความเข้มข้นของแบคทีเรียเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้นเป็น 2 เท่าและพบว่าอัตราการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลส (production rate of BC) เท่ากับ 0.116 g/L.h ซึ่งมากกว่าการหมักในถังหมักที่ใช้การกวน และพบว่าการสร้างเซลลูโลสถูกจำกัดโดยปริมาณออกซิเจนที่ได้รับ ดังนั้นเพื่อให้ได้ปริมาณเซลลูโลสที่มากขึ้นจึงต้องมีการเพิ่มอัตราการให้อากาศ ลักษณะของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในถังหมักแบบ airlift มีลักษณะที่แตกต่างไปจากเส้นใยที่ได้จากการหมักในถังหมักที่ใช้การกวน

Chao *et al.* (2000) ได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* subsp. *Sucrofermentans* BPR2001 ในถังหมักแบบ airlift ขนาด 50 ลิตร ชนิด internal-loop พบว่าความเข้มข้นของฟรุคโตสที่ 40 g/L อัตราการผลิตเซลลูโลสเป็น 0.059 g/L per h เมื่อให้อากาศที่เพิ่มสัดส่วนของออกซิเจนเข้าไป พบว่าอัตราการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 0.093 g/L per h เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของฟรุกโตสอยู่ในช่วง 30-70 g/L พบว่าที่ความเข้มข้นฟรุกโตส 60-70 g/L ให้อัตราการผลิตเซลลูโลสสูงสุด 0.22 g/L per h และได้ปริมาณเซลลูโลส 10.4 g/L จากการทดลองพบว่าการสังเคราะห์เซลลูโลสขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนและความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Cheng *et al.* (2002) ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* ในถังหมักแบบ modified airlift พบว่าหลังจากระยะเวลาการหมักผ่านไป 72 ชั่วโมง ให้ปริมาณเซลลูโลสเป็น 7.72 g/L ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบ airlift ปกติถึง 3 เท่าและยังพบว่าเส้นใยแผ่นเซลลูโลสมีลักษณะพิเศษ ขนาดเฉลี่ยประมาณ 10 mm ซึ่งต่างจากเซลลูโลสจากการหมักในถังหมักที่ใช้การกวน จากผลการทดลองสรุปได้ว่า modified airlift เหมาะสมต่อการหมักแบคทีเรียเซลลูโลส นอกจากนี้ Cheng *et al.* (2002) ได้ทำการดัดแปลงถังหมักแบบ airlif เนื่องจากการหมักใน airlift ประสบปัญหาในการให้ปริมาณเซลลูโลสที่ไม่สูงมากนักเพราะออกซิเจนไม่เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อ การแก้ปัญหามีสองประการคือ การเพิ่มประสิทธิภาพของ oxygen transfer ในถังหมักโดยเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนเข้าไปในอากาศที่ให้ในถังหมักซึ่งไม่เหมาะสมเนื่องจากค่าใช้จ่ายสูง และอีกวิธีหนึ่งคือการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่าง gas phase และ liquid phase โดยการลดขนาดของฟองอากาศในถังหมัก ในการศึกษาใช้ถังหมัก modified airlift reactor โดยใช้ multiple rectangular wire-mesh draft tubes เพื่อเพิ่ม oxygen transfer และ mixing capacity เนื่องจาก draft tube ลักษณะดังกล่าวสามารถแยกฟองอากาศที่เกาะกลุ่มกันออกได้และทำให้ขนาดเล็กลงทำให้ K_La เพิ่มขึ้นเป็น 50% เมื่อเทียบกับถังหมักแบบ airlift จากการศึกษาพบว่า modified airlift ให้ mixing time สั้นกว่าถังหมักแบบ airlift 25% ทำให้ oxygen transfer และ liquid mixing เหมาะสมต่อการหมักแบคทีเรียเซลลูโลส การหมักโดยใช้ modified airlift เมื่อระยะเวลาการหมัก 67 ชั่วโมงให้ปริมาณเซลลูโลส 7.56 g/L เปรียบเทียบกับรายงานของ Chao *et al.* (2000) พบว่าการใช้ modified airlift ประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่าเนื่องจากการใช้การเพิ่มสัดส่วนของออกซิเจนเข้าไปในอากาศที่ให้ในถังหมักได้ปริมาณเซลลูโลส 7.93 g/L ซึ่ง modified airlift ไม่ใช้การเพิ่มออกซิเจนเข้าไปแต่ได้เซลลูโลสในปริมาณที่ไม่ต่างกันถือเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและประหยัดพลังงาน ในระยะเวลาที่ไม่ต่างกัน

เลิศฤทธิ์ เลิศวัฒนวัลลี (2543) ได้เลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อให้ได้มากที่สุดเพื่อเตรียมหัวเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรการทำงาน 1 ลิตร พบว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ คือ 2 vvm และอัตราการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาทีโดยได้ปริมาณเชื้อสูงสุด (maximum cell concentration) เท่ากับ 1.1 x 10^6 CFU/ml ที่เวลา 15 ชั่วโมง และได้น้ำหนักเปียกเมื่อเลี้ยงในสภาวะนิ่ง (static culture) เท่ากับ 5.34 กรัม เมื่อเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อจากอาหารสังเคราะห์เป็นอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบ พบว่าได้ปริมาณเชื้อสูงสุดเท่ากับ 1.05 x 10^7 CFU/ml ที่เวลา 18 ชั่วโมง และได้น้ำหนักเปียกเมื่อเลี้ยงในสภาวะนิ่งเท่ากับ 11.14 กรัม ซึ่งน้ำหนักเปียกของเซลลูโลสจะแปรผันตรงกับปริมาณเชื้อ เชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบ เลือกอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบใน

การขยายขนาดการผลิต การเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* ในถังหมักที่มีการให้อากาศและการกวนเพื่อนำเอาเชื้อที่ได้ไปใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตเซลลูโลสจะมีความเหมาะสมในการผลิตระดับอุตสาหกรรมมากกว่าการเลี้ยงในสภาวะนิ่งและเขย่าเนื่องจากได้ปริมาณเชื้อในปริมาณมากในระยะเวลาสั้นทำให้สามารถลดระยะเวลาในกระบวนการผลิตเซลลูโลสลงได้มาก

2.5.2 ลักษณะของแบคทีเรียเซลลูโลสในถังหมักแบบ airlift

มีลักษณะของเส้นใยและมีคุณสมบัติที่แตกต่างไปจากเซลลูโลสจากการเลี้ยงโดยวิธีอื่น เช่น ultra-fine fibers, excellent mechanical strength, biodegradability, high water-holding capacity, high crystallinity ในขณะที่การเลี้ยงในสภาวะการกวน เนื่องจากมี high shear stress ระหว่างการกวนทำให้รูปร่างลักษณะ (morphological) และโครงสร้างผิดปกติ (abnormalities) ไปจากเซลลูโลสจากการหมักแบบวางนิ่ง ซึ่งจะสร้างเซลลูโลสที่เป็นแผ่น (pellicle) ขณะที่การหมักแบบการกวนจะให้เซลลูโลสเป็น fibrous ค่า crystallinity index, Young's modulus และ degree of polymerization ต่ำกว่าแบบ pellicle (Cheng *et al.* 2002)

2.6 ปัจจัยในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส

โดยทั่วไปการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียจะขึ้นกับปัจจัยสองประการ ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์เซลลูโลส ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาปัจจัยสองประการนี้ควบคู่กันไป

2.6.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*

การเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่นำมาผลิตเซลลูโลสเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงอย่างมากว่าเชื้อนั้นเป็นสายพันธุ์ที่เจริญได้เร็ว สร้างเซลลูโลสได้ในปริมาณสูงและทนต่อสภาพกรดได้ดี (วราวุฒิ ครูส่ง. 2539ก)

Ishikawa *et al.* (1995) พบว่า เมื่อทำให้ *A. xylinum* subsp *sucrofermentans* กลายพันธุ์ด้วย Sulfaguanidine และ p-aminobenzoic acid (PABA) ทำให้ผลผลิตเพิ่มจากเดิมถึง 40 เปอร์เซ็นต์

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.6.2 ความเป็นกรดด่าง

ในระหว่างการหมักค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะค่อย ๆ ลดลงเนื่องจากเชื้อมีการสร้างกรดกลูโคนิกและกรดอะซิติก สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่เวลาต่าง ๆ นั้นจะลดลงเพียงเล็กน้อยและไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อเพราะการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างไม่ได้เกิดขึ้นอย่างทันทีทันใด นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด-ด่างตลอดระยะเวลาการหมักยังคงอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* จะอยู่ในช่วงระหว่าง 3.5-4.0

Verchuren *et al.* (2000) ศึกษาการหมักที่สภาพผิวนิ่งโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นน้ำหมักและมีการเติมซูโครส ศึกษาการเจริญและการสร้างเซลลูโลสที่ pH 3.0 4.0 5.0 และ 6.0 พบว่าที่ pH 4.0 และ 5.0 ให้ผลผลิตในการสร้างเซลลูโลสมากที่สุด

Hwang *et al.* (1999) ศึกษาการหมักในถังหมัก (jar fermentor) โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในการสังเคราะห์เซลลูโลส เชื้อ *A. xylinum* จะออกซิไดส์กลูโคสเป็นกรดกลูโคนิค (gluconic acid) และใช้กรดกลูโคนิคในการสังเคราะห์เซลลูโลส จากการศึกษาพบว่า pH 4.0 เป็น pH ที่เหมาะสมในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิก แต่ pH 5.5 เหมาะสำหรับการเจริญของเซลล์และการสร้างเซลลูโลส ในระหว่างการหมัก การ shifting pH จาก 4.0 เป็น 5.5 จะช่วยในการสร้างเซลลูโลสได้มากขึ้นและลดระยะเวลาของการหมัก

Bungay *et al.* (1999) ได้ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการสร้างเซลลูโลสในระหว่างการหมัก ในถังหมักแบบ Rotating Disk Bioreactor พบว่าการควบคุมความเป็นกรดด่างให้คงที่ที่ pH = 5.0 โดยการเติมด่างอ่อน (dilute NaOH) ตลอดระยะเวลาของการหมักช่วยให้เชื้อ *A. xylinum* สามารถผลิตเซลลูโลสได้มากที่สุด

2.6.3 ออกซิเจน

เนื่องจาก *A. xylinum* เป็น strictly obligate aerobe ซึ่งมีความสามารถในการสร้างเซลลูโลสในสภาวะที่มีอากาศ ดังนั้นการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อปริมาณออกซิเจนมีเพียงพอต่อความต้องการของเซลล์เท่านั้น (วราวุฒิ ครูส่ง และกรวิกา สุขศรีวงษ์. 2539ข)

Watanabe *et al.* (1995) ทำการหมักเซลลูโลสในสภาวะนิ่งเพื่อศึกษาผลกระทบของ oxygen tension ใน gaseous phase พบว่ามีผลกระทบต่อการผลิตเซลลูโลสและลักษณะทางกายภาพของเมมเบรนของเชื้อ *A. xylinum* โดยที่ oxygen tension สูงจะทำให้วุ้นเซลลูโลสแข็งแรงกว่า (harder membrane) ในสภาวะ oxygen tension ต่ำซึ่งจะได้ลักษณะวุ้นเซลลูโลสที่อ่อน

49644

(softer membrane) และพบว่าปริมาณเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้นเมื่อ oxygen tension ใน gaseous phase เพิ่ม

Kouda *et al.* (1997) เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ให้อากาศในถังหมักขนาด 50 ลิตร พบว่าอัตราการผลิตเซลลูโลส (production rate) ขึ้นกับ oxygen transfer rate

2.6.4 แหล่งคาร์บอน

วราวุฒิ ครูส่ง (2539ก) ได้เติมน้ำตาลซูโครสลงในน้ำมะพร้าวในการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว เนื่องจากปริมาณน้ำตาลในน้ำมะพร้าวไม่แน่นอน และเพื่อให้แน่ใจว่ามีปริมาณคาร์บอนมากพอสำหรับการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum*

เชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ น้ำตาลเชิงซ้อน โดยส่วนใหญ่นิยมใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากมีราคาถูก หาง่าย และเซลลูโลสที่ได้จากการใช้น้ำตาลซูโครสก็มีลักษณะหนาและเนื้อแน่น

Bungay *et al.* (1999) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในการหมักแบบ batch rotating disk bioreactor โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ในระหว่าง 5 g/L-100 g/L หมักเป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาล 25 g/L ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุดและการเพิ่มน้ำตาลมากกว่านี้ไม่ทำให้เชื้อสร้างเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้น

Seto *et al.* (1997) ได้คัดเลือกเชื้อ *A. xylinum* จากแหล่งต่าง ๆ แต่ก่อนนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อโดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากมีราคาถูก แต่ไม่ได้เชื้อที่ให้ปริมาณเซลลูโลสสูง จากการศึกษาต่อมาสรุปได้ว่า Corn Steep Liqour (CSL) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการสังเคราะห์เซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum* โดยใช้อาหาร CSL-fruc เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ พบว่าได้เชื้อที่สร้างเซลลูโลสได้สูง 4 สายพันธุ์และเชื้อที่คัดเลือกได้นี้มีคุณสมบัติพิเศษคือ ตลอดระยะเวลาของการหมัก pH ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและได้ปริมาณเซลลูโลสสูงประมาณ 9.0 g/L pH 4.8-5.5 แต่เมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสปริมาณเซลลูโลสลดลงเป็น 2 g/L pH 3.6-5.3 เป็นที่ทราบกันดีว่า *A. xylinum* ออกซิไดส์กลูโคสเพื่อสร้างกลูโคเนท (gluconate) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปฏิกิริยาออกซิเดชั่นทำให้เซลลูโลสลดลง pH ที่ลดลงจะยับยั้งการเจริญของเซลล์และการสร้างเซลลูโลส และพบว่า pH ของสายพันธุ์ที่แยกได้ในการศึกษาไม่ลดลงซึ่งอาจจะมาจากความสามารถในการออกซิไดส์กลูโคสต่ำ

Kojima *et al.* (1998) พบว่า *A. xylinum* subsp. *Nanoacetoxidan* subsp. *nov* SPR 2001 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่เจริญและสร้างเซลลูโลสในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส และต่างจาก

Acetobacter sp. อื่น ๆ คือ ไม่สามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและแลกเทตให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้

2.6.5 **แหล่งไนโตรเจน**

สารอาหารไนโตรเจนสำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรีย สารประกอบไนโตรเจนที่ใช้ได้ดีที่สุดคือแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$)และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) รองลงมาคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แต่เนื่องจากไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตละลายยากจึงใช้แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแทนแต่ในทางอุตสาหกรรมนิยมใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเนื่องจากมีราคาถูก

ตามธรรมชาติแล้วน้ำมะพร้าวมีสารประกอบไนโตรเจนในรูปของโปรตีนอยู่ประมาณร้อยละ 0.4 แต่การเติมสารประกอบไนโตรเจนลงไปในการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว เพื่อช่วยเร่งให้เชื้อสร้างแผ่นวุ้นได้หนาในระยะเวลาสั้นและช่วยเชื้อเจริญได้ดี (วราวุฒิ ครูส่ง. 2539ก)

2.6.6 **อุณหภูมิ**

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างวุ้นมะพร้าวอยู่ในช่วง 28-32 องศาเซลเซียส เนื่องจากการสร้างวุ้นสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเชื้อเป็นอย่างมาก ดังนั้นการสร้างแผ่นวุ้นจะเกิดได้เร็วเมื่อเชื้อเจริญได้ดี อุณหภูมิที่ต่ำหรือสูงกว่านี้มาก ๆ ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจะทำให้ได้แผ่นวุ้นที่บางและเนื้อนิ่มโดยเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียสและสูงกว่า 35 องศาเซลเซียสการสร้างแผ่นวุ้นจะไม่เกิดขึ้นเลย (Alaban. 1962)

2.7 จุลินทรีย์ปนเปื้อนในกระบวนการหมักวุ้นเซลลูโลส

สุเนตร มนต์วิเศษ และคณะ (2543) ได้ศึกษาถึงจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในกระบวนการหมักวุ้นน้ำมะพร้าวและผลของกรดอะซิติก แอลกอฮอล์ และโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ต่อการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อน จากการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อที่ปนเปื้อนในวุ้นน้ำมะพร้าวในเขตจังหวัดสมุทรสงครามและที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร พบว่าเชื้อปนเปื้อนต่างๆเป็นเชื้อยีสต์และแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้วุ้นเละ ไม่เกิดแผ่น เนื้อวุ้นเป็นรู น้ำขุ่น วุ้นเน่า วุ้นหนาและมีเมือก วุ้นเกิดแผ่นแก๊สดันจนแผ่นวุ้นโค้งไม่เรียบ เกิดจุดสีขาวบนเนื้อวุ้นและวุ้นเป็นฝ้าเป็นต้น ยีสต์ปนเปื้อนที่แยกได้แบ่งเป็นเชื้อยีสต์ 16 สายพันธุ์ ยีสต์ปนเปื้อนนี้สามารถที่จะสันนิษฐานเชื้อได้บางกลุ่มโดยดูจากลักษณะของสปอร์ รูปร่างของเซลล์ ปฏิกิริยาการหมักและการเกิดแก๊ส กลุ่มยีสต์ปนเปื้อนที่พบมากที่

สุดเป็นสายพันธุ์ของ *Candida* spp., *Saccharomyces* spp. และ *Klockera* spp. ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ปนเปื้อนมีสองลักษณะคือ รูปไข่ และรูปกลม สำหรับแบคทีเรียปนเปื้อนที่พบ เป็นกลุ่มของแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ เมื่อย้อมสีเซลล์ด้วยการย้อมสีแบบแกรม (Gram' staining) พบว่ามีเซลล์สองลักษณะ คือ รูปกลมแกรมบวก และรูปแท่งแกรมลบ จากลักษณะทางสันฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียปนเปื้อนที่แยกได้จัดเป็นแบคทีเรียสองสายพันธุ์คือ Micrococcaceae และ Enterobacteriaceae

2.8 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว

การผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวด้วยเชื้อ *A. xylinum* นี้อาจใช้วัตถุดิบทางการเกษตรชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น น้ำสับปะรด น้ำอ้อย น้ำนมสด น้ำเหลืองน้ำนม เป็นต้น เนื้อวุ้นที่ได้จะมีลักษณะคล้ายกัน อาจมีกลิ่นของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตออกมาบ้าง ทั้งนี้ปัจจัยในการผลิตย่อมแตกต่างกันออกไปบ้าง เช่น ความเข้มข้นของวัตถุดิบ ปริมาณน้ำตาล สารประกอบไนโตรเจนและสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้

2.8.1 กากน้ำตาล

ศิริพงษ์ เปรมจิต (2542) ได้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในสภาวะการหมักแบบวางนิ่ง (surface fermentation) ในอาหารดัดแปลง Hestrin and Schramm (HS) (Hestrin and Schramm. 1954) ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและสารอาหารเพื่อทดแทนน้ำตาลกลูโคส yeast extract และ peptone ในอาหารมาตรฐานเพื่อลดต้นทุนในการผลิต พบว่าสามารถส่งเสริมให้เชื้อ *A. xylinum* ATCC 10245 สร้างผลผลิตสูงสุด (276%) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 7% เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้จากอาหาร HS มาตรฐานที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 2% เป็นแหล่งคาร์บอน และแม้อาหารดัดแปลง HS จะปราศจาก yeast extract หรือ peptone อย่างใดอย่างหนึ่งหรือปราศจาก yeast extract และ peptone ก็ยังคงให้ผลผลิตของเซลลูโลสสูงกว่าอาหาร HS มาตรฐานเท่ากับ 234%, 207% และ 145% ตามลำดับ

2.8.2 น้ำหางนม

น้ำหางนมหรือน้ำเวย์ (whey) เป็นผลผลิตพลอยได้ส่วนใหญ่จากการผลิตเนยแข็งหรือการแยกเคซีน (casein) โดยประมาณว่าจะได้น้ำหางนม 85-90% ของน้ำนมที่ใช้ในการผลิตเนยแข็งหรือเคซีน น้ำหางนมมีลักษณะเป็นของเหลวใสมีสีค่อนข้างเขียวอมเหลือง มีส่วนที่มีคุณค่าทางอาหารสูงอยู่หลายประการ เช่น แลคโตส วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ เป็นต้น ส่วนประกอบของน้ำหางนมโดย

ประมาณ (เปอร์เซ็นต์) พอกล่าวได้ดังนี้ น้ำตาลแลคโตส 4.8 โปรตีน 0.85 ไขมัน 0.35 แร่ธาตุ 0.5 และน้ำ 93.40 และน้ำหางนมมีค่า BOD ค่อนข้างสูงคือประมาณ 12000-30000 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นกับกรรมวิธีในการผลิตเนย จากการศึกษาพบว่ามีการนำน้ำหางนมไปใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน เช่นใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตวิตามินบี 12 การผลิตไรโบเฟลวิน การผลิตน้ำส้มสายชู การผลิตแลคโตส และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เป็นต้น นอกจากการนำไปใช้ประโยชน์ดังที่กล่าวมา วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ (2536) ได้ทำการศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากน้ำหางนมด้วยกระบวนการหมักนี้ภายใน 14 วัน พบว่าสามารถลดค่า BOD ได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหางนมเมื่อเริ่มต้นการหมัก ในการผลิตเซลลูโลสจากน้ำหางนมโดยใช้เชื้อ *A. xylinum* DK พบว่าลักษณะของน้ำหางนมที่เหมาะสมคือน้ำหางนมที่ผ่านการแยกตะกอนภายหลังจากการฆ่าเชื้อ ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตประกอบด้วยความเข้มข้นของน้ำตาล 7.5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในขวดบรรจุน้ำหมัก 150 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 7-14 วัน จะได้วุ้นเซลลูโลสที่มีความหนาและน้ำหนักสูงสุด ดังนั้นการผลิตเซลลูโลสจากน้ำหางนมจึงเป็นทางเลือกที่ดีทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของของเสียที่ออกจากการผลิตเนยแข็งหรือการแยกเคซีน และที่สำคัญยังเป็นการช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

2.8.3 น้ำกะทิ

จารุวรรณ์ ศิริพรรณพร และคณะ (2544) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำกะทิ พบว่าเมื่อใช้น้ำกะทิจากมะพร้าวแก่ไม่ต้มและเจือจางด้วยน้ำประปา 60 เท่า พบว่าหัวเชื้อสายพันธุ์ *A. xylinum* T_2 ให้ผลผลิตวุ้นมากกว่าหัวเชื้อ *A. xylinum* PMM จึงเลือกใช้สายพันธุ์ T_2 เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป ผลปรากฏว่าน้ำกะทิที่ต้มเดือดให้ผลผลิตวุ้นน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกะทิไม่ต้มอย่างชัดเจน การเพิ่มปริมาณหัวเชื้อจาก 10% เป็น 15% มีผลทำให้ผลผลิตวุ้นเพิ่มขึ้น ส่วนการเพิ่มปริมาณน้ำตาลจาก 5% เป็น 7% ผลผลิตวุ้นจะได้เพิ่มขึ้นจากความหนา 1.05 เซนติเมตร น้ำหนัก 350 กรัม/ถาด เป็นความหนา 1.52 เซนติเมตร น้ำหนัก 496 กรัม/ถาด ตามลำดับ ซึ่งการใช้น้ำตาลเพิ่มอีก 2% เป็นการเพิ่มผลผลิตวุ้นที่มีความคุ้มค่ากับการลงทุนเมื่อใช้น้ำกะทิจากมะพร้าวแก่จัดเป็นวัตถุดิบในการผลิตได้ผลผลิตวุ้นมากที่สุดคือมีความหนา 1.60 เซนติเมตร น้ำหนัก 636 กรัม/ถาด

2.8.4 น้ำมะพร้าว

วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ (2535) ได้ใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบในการผลิตวุ้นสวรรค์โดยได้เน้นถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตวุ้นสวรรค์จากเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากประเทศฟิลิปปินส์ พบว่าสภาวะการผลิตวุ้นสวรรค์ในน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมประกอบด้วยความเข้มข้นของน้ำตาล 6 เปอร์เซนต์ กรดอะซิติก 1.5 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.9 เปอร์เซ็นต์ หัวเชื้อ 40 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักเป็นเวลา 7 และ 14 วัน ได้ชิ้นวุ้นมีความหนา 1.20 และ 1.60 เซนติเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเบื้องต้นของการขยายขนาดการหมักโดยใช้ภาชนะต่าง ๆ พบว่าความหนาของชิ้นวุ้นอยู่ในระดับใกล้เคียงกันแสดงว่าวุ้นสวรรค์นี้สามารถขยายขนาดการผลิตได้เป็นอย่างดี

น้ำมะพร้าวแก่เป็นวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร โดยประเทศไทยสามารถผลิตมะพร้าวได้ปีละล้านกว่าตันโดยคำนวณจากมะพร้าว 100 ผลหนัก 125 กิโลกรัม (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2539) มะพร้าวแก่แต่ละผลจะมีน้ำมะพร้าวอยู่ประมาณครึ่งลิตรซึ่งมีคุณค่าอาหารพอสมควร อัจฉรา มีวาสนา (2510) ได้วิเคราะห์ไว้ว่าในน้ำมะพร้าวแก่ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย น้ำ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเถ้าในปริมาณ 94.6; 1.0; 2.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีแคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก และวิตามินซี เท่ากับ 20.7; 25.4; 0.4 และ 1.4 มิลลิกรัมตามลำดับ และยังมีวิตามินบีรวมอีกด้วยแต่ไม่พบไขมัน Verderbelt (1954) ได้วิเคราะห์หาวิตามินบีรวมหลายชนิดต่างๆ พบว่า น้ำมะพร้าว 1 มิลลิลิตร มีกรดนิโคทินิก กรดแพนโททินิก ไบโอติน ไรโบฟลาวิน และกรดฟอลิก เท่ากับ 0.64; 0.52; 0.02; 0.01 และ 0.003 ไมโครกรัม ตามลำดับ นอกจากนั้นน้ำมะพร้าวยังมีสารเร่งการเจริญประเภทฮอร์โมนอยู่ด้วย

น้ำมะพร้าวที่ใช้ควรเป็นน้ำมะพร้าวแก่ ไม่ควรใช้น้ำมะพร้าวที่เริ่มงอก น้ำมะพร้าวที่จะนำมาใช้ควรจะเป็นน้ำมะพร้าวที่สด ใหม่และไม่มีการปนเปื้อนของน้ำมะพร้าวที่เน่าเสียมาก่อน เมื่อได้มาแล้วควรนำมาต้มฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการซึ่งอาจจะปนมากับน้ำมะพร้าว การใช้น้ำมะพร้าวที่เจือจางมาผลิตวุ้นจะทำให้ผลผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวลดลง

น้ำมะพร้าวที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวควรเป็นน้ำมะพร้าวที่สะอาด มีสิ่งเจือปนอยู่น้อยที่สุดหรือไม่มีเลยและข้อสำคัญคือน้ำมะพร้าวนี้ไม่ควรมีการปนเปื้อน (contamination) จากเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการสร้างวุ้นน้ำมะพร้าวของเชื้อ *A. xylinum* ได้ นอกจากนี้น้ำมะพร้าวที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวก็ควรปราศจากสารปนเปื้อนจำพวกโลหะหนัก หรือสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้

น้ำตาลเป็นแหล่งของคาร์บอนที่ให้การเจริญเติบโตและสร้างแผ่นวุ้น น้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำมะพร้าวจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการเจริญ แต่เนื่องจากปริมาณน้ำตาลในน้ำมะพร้าวมีไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับมะพร้าว การเติมน้ำตาลในน้ำมะพร้าวก็เพื่อให้แน่ใจว่ามีปริมาณคาร์บอนมากพอสำหรับการเจริญและการสร้างวุ้น เชื้อ *A. xylinum* สามารถใช้คาร์บอนจากแหล่งต่างๆได้หลายแหล่ง เช่น กาแลคโตส ซูโครส มอลโตส และเดกโตรส ทั้งนี้เชื้อสามารถสร้างวุ้นจากเดกโตรสและซูโครสได้หนาและแข็งแต่เนื่องจากว่าเดกโตรสมีราคาสูงกว่าซูโครสมากดังนั้นในการผลิตวุ้นจึงนิยมใช้ซูโครสเพราะหาง่ายและราคาไม่แพง

2.9 วัสดุที่เชื้อยึดเกาะ

2.9.1 ฝ้าย

ฝ้ายเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง สูงประมาณ 2-5 ฟุตหรือมากกว่านี้ มีลำต้นจริงและแตกกิ่งเวียนรอบต้น ใบฝ้ายเกิดที่ข้อของลำต้นและกิ่ง ใบมีก้านยาว ส่วนมากที่โต้ใบ ก้านใบและลำต้นมักมีขนสั้นปกคลุมบาง ๆ ดอกฝ้ายจะเกิดที่ข้อเหนือโคนใบเมื่อดอกบานจะมีสีขาวนวลถึงสีเหลือง ฝ้ายจัดว่าเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กที่ปรับตัวเข้ากับดินฟ้าอากาศได้ดีมากสามารถทนความหนาวเย็นได้

ทางพฤกษศาสตร์จัดให้ฝ้ายอยู่ในวงศ์มัลวาซีอี (Family Malvaceae) ได้แก่ พวกปอแก้ว ชบา กระเจี๊ยบมอญ และอยู่ในสกุลกอสซีเพียม (Genus Gossypium) เส้นใยที่เกิดจากเปลือกเมล็ดของฝ้ายปลูกจะยาวรูปบิดสามารถปั่นเป็นเส้นด้ายได้

ฝ้าย (Cotton) ที่ใช้กันทั่วไปได้มาจากปุยที่ติดอยู่กับเมล็ดของฝ้ายดอก เป็นใยสั้น ๆ ประกอบด้วยเซลลูโลสเกือบทั้งหมด ฝ้ายมีหลายพันธุ์ ให้ใยที่แตกต่างกันเล็กน้อย บางชนิดให้ใยยาว บางชนิดให้ใยสั้น บางชนิดปุยจะมีสีขาวกว่าอีกชนิดหนึ่ง หลังจากฝ้ายดอกเติบโตเต็มที่และเก็บแล้วจะต้องนำมาแยกชั้นคุณภาพและจำหน่ายให้กับแหล่งตลาดใหญ่ การตัดสินชั้นคุณภาพของฝ้าย ใช้ความยาว สี และปริมาณสิ่งเจือปนที่มีอยู่ในมัดฝ้ายเป็นเกณฑ์ (นวลแข ปาลิวนิช. 2534)

คุณภาพและมาตรฐานของเส้นใยซึ่งอาจจำแนกวิธีการกำหนดคุณภาพได้เป็น 2 แบบ คือ

2.9.1.1 Physical test ได้แก่ การวัดขนาดความยาวและความทนทานของเส้นใย วิธีการที่นิยมใช้ ได้แก่ความเหนียว (strength test) โดยการหา breaking load ซึ่งหมายถึงแรงหรือน้ำหนักสูงสุดที่ทำให้เส้นใยนั้นขาด มีหน่วยเป็น gm/mm หรือ lb/tex ในกรณีรวมเส้นใยหลายเส้นเข้าด้วยกันเป็นเส้นด้าย ความเหนียวเรียกว่า tensile strength ซึ่งหมายถึงแรงหรือน้ำหนักสูงสุดที่ทำให้เส้นด้ายขาดต่อพื้นที่ผิวหน้าตัดของเส้นด้าย หรือ lb/in^2 นอกจากนี้ยังมีการวัดคุณสมบัติของเส้นใยในลักษณะอื่น ๆ

เช่น ขนาดของเส้นใย (micronaire) ความแข็ง (stiffiness) คุณสมบัติการโค้งงอ (bending properties) การยืดหยุ่น การคงรูป (resillience) ความทนทานต่อการขัดสี (resistance to fatigue หรือ abrasion) และ fiber fineness คือขนาดของเส้นใยซึ่งอาจจะบอกเป็นจำนวนเส้นใยต่อหน้าตัด หรือบอกเป็นขนาดของหน้าตัด หรือน้ำหนักต่อหน่วยความยาวเส้นใย 1 กม. (tex)

2.9.1.1.1 ฝ้ายที่มีความยาวมากกว่าจะละเอียด (เส้นเล็ก) กว่าฝ้ายปุยสั้น ฝ้ายที่มีความยาว 1 นิ้วขึ้นไป ใช้ปั่นเป็นเส้นด้ายและทอผ้าซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันทั่วไป ความยาวยิ่งมากขึ้นก็จะปั่นเป็นด้ายเส้นเล็กลง หรือทอเป็นผ้าเนื้อละเอียดมากขึ้น ส่วนฝ้ายที่ความยาวต่ำกว่า 1 นิ้วลงมาจะปั่นเป็นด้ายเส้นใหญ่ซึ่งใช้ทอเป็นผ้าเนื้อหยาบมาก ๆ ได้แก่ จำพวกผ้าใบ ถ้าสั้นกว่านี้มาก ๆก็จะไปใช้ทำของอื่น ๆ เช่น ไส้ผ้านวม สำลี เป็นต้น

2.9.1.1.2 ความละเอียดอ่อน (micronaire) ทดสอบโดยเครื่องวัดความละเอียดอ่อน (WIRA cotton fineness meter) เป็นค่าที่แสดงความละเอียดอ่อนและความแก่ของเส้นใยในเวลาเดียวกัน เมื่อทดสอบเส้นใยที่ค่าความแก่ (maturity) ใกล้เคียงกัน ค่า micronaire ที่ต่ำกว่าแสดงว่าฝ้ายมีความละเอียดดีกว่าซึ่งสามารถปั่นเป็นด้ายเบอร์สูง (เส้นเล็ก) กว่าฝ้ายที่หยาบ แต่เมื่อเปรียบเทียบฝ้ายที่มีความละเอียดเท่า ๆ กันหรือฝ้ายพันธุ์เดียวกัน ฝ้ายที่แก่กว่าจะมีค่า micronaire สูงกว่าฝ้ายที่ไม่แก่

2.9.1.1.3 ความเหนียวของกลุ่มเส้นใย (fiber bundle strength) เป็นการวัดความเหนียวของกลุ่มเส้นใยด้วยเครื่อง Stelometer หน่วยเป็น g/tex ใช้แรงดึงให้กลุ่มเส้นใยขาดออกจากกันแล้วหาค่าความเหนียว (tenacity)

2.9.1.1.4 ความสมบูรณ์ (maturity) ความแก่ของฝ้าย ถือเอาความหนาของผนังชั้นใน (secondary wall) ซึ่งเป็นส่วนที่สะสมของเซลลูโลสเป็นเกณฑ์ ฝ้ายที่เส้นใยผนังหนามาก แสดงว่าแก่มาก ในทางปฏิบัติจะนำเส้นใยมาจำนวนหนึ่งส่องกล้องจุลทรรศน์หา % เส้นใยแก่ และเส้นตาย (ผนังบางมาก) แล้วคำนวณค่าเป็นอัตราส่วนความแก่ (maturity ratio) เส้นใยที่มีความสมบูรณ์ต่ำ ทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับการย้อมสีและอาจทำให้ความเหนียวของด้ายลดลง

2.9.1.2 Chemical test มักจะวิเคราะห์ปริมาณ cellulose, hemicellulose, lignin, pectin และ resin fats หรือ wax ดังแสดงในตารางที่ 2.3 การวิเคราะห์ทางเคมีมีความสำคัญในกรณีใช้เส้นใยสำหรับอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ (กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2527)

ตารางที่ 2.3 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของเส้นใยฝ้ายจากการทดลองของกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา เมื่อความชื้นของฝ้าย 8 % มีดังนี้

องค์ประกอบของเส้นใยฝ้าย	อัตราส่วน (เปอร์เซ็นต์)
เซลลูโลส	94
โปรตีน (%N x 6.25)	1.3
สารเพคติน	1.2
ขี้ผึ้ง (wax)	0.6
เถ้า (ash)	1.2

ที่มา : ดัดแปลงมาจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2527)

2.9.2 **บวบ**

บวบเป็นพืชผักตระกูลแตงที่คนไทยคุ้นเคยกันมานาน โดยเก็บผลอ่อนมารับประทานเป็นผัก ส่วนบวบที่ไม่ได้ถูกเก็บปล่อยจนแก่แห้งแล้วเนื้อหลุดหายไปเหลือแต่เส้นใยที่เรียกว่ารังบวบจะถูกเก็บมาไว้ใช้ในการอาบน้ำ ขัดถูหม้อจาน เฉพาะรังบวบที่นำมาใช้ถูตัวตอนอาบน้ำกำลังเกิดเป็นกระแสความนิยมในหมู่ผู้สนในในการแพทย์ทางเลือกเพราะการถูตัวด้วยเส้นใยธรรมชาติที่มีลักษณะเส้นใยพันกันไปมา (ธรณิศวร์ พิรุณละออง. 2545) [Internet, C] จะช่วยให้การไหลเวียนของโลหิตดีขึ้นและกระตุ้นผิวหนังให้สดชื่นเพราะเซลล์ผิวหนังที่ตายแล้วได้ถูกกำจัดออกไป

ปัจจุบันบวบยังเป็นผักที่คนนิยมรับประทานและมีการปลูกกันอย่างกว้างขวาง บวบที่นิยมปลูกกันก็คือบวบหอม ที่ผลอ่อนจะมีรสหวานอร่อยกว่าชนิดอื่น มีรสหวาน จึงใช้ปรุงเป็นอาหารได้หลายชนิด ผลอ่อนของบวบถือเป็นยาบำรุงร่างกายชั้นยอด เพราะมีโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เกลือแร่และวิตามิน โดยเฉพาะวิตามินซีมีปริมาณที่สูงมาก ในผลอ่อนของบวบยังประกอบด้วย ซาโปนิน (saponins) สารเมือก (mucllage) ซึ่งมีสรรพคุณในการหล่อลื่นทำให้ช่วยในการระบายอ่อน ๆ

ผลอ่อนของบวบประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) ที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิดจึงสอดคล้องกับความเชื่อของคนไทยโบราณ ที่เชื่อว่าการกินผลบวบอ่อนจะช่วยขับน้ำนม เนื้อผลบวบที่กินเป็นผักมีแร่ธาตุมาก วิตามินน้อย เนื้อบวบสะอาด เขียวใส หวานนิด ๆ ตามธรรมชาติ และไม่ค่อยปนเปื้อนด้วยยาฆ่าแมลง เพราะบวบไม่ค่อยมีแมลงรบกวน (บวบ : สมุนไพรแบบเบ็ดเสร็จ. มปป.) [Internet, D]

2.9.3 พลาสติก

คำว่า พลาสติก มาจากรากศัพท์ภาษากรีกว่า plastikas ซึ่งหมายความว่าหล่อหรือหลอมเป็นรูปร่างต่าง ๆ ได้ เพราะพลาสติกสามารถนำมาหล่อให้เป็นรูปร่างต่าง ๆ ตามแบบโดยใช้ความร้อนและแรงอัดเพียงเล็กน้อย จุดหลอมเหลวอยู่ระหว่าง 80-350 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพลาสติก

พลาสติกเป็นสารประกอบของมาโครโมเลกุล (Macromolecule) และยังมีใช้อยู่ในปัจจุบัน เช่น เซลลูโลส (Cellulose) โปรตีน (Protein) และยางธรรมชาติ มาโครโมเลกุลประกอบด้วยสารไมโครโมเลกุล (Micromolecule) เป็นจำนวนมากและพลาสติกนั้นก็ประกอบด้วยมาโครโมเลกุล วัสดุที่ประกอบด้วยมาโครโมเลกุลที่มีอยู่ตามธรรมชาติ (เช่น ยางธรรมชาติ เซลลูโลส โปรตีน ฯลฯ) หรือได้จากการสังเคราะห์สารประกอบโมเลกุลต่ำ (เช่น Ethylene, Benzol, Formaldehyde ฯลฯ) มาโครโมเลกุลนั้นสามรถทำได้โยการสังเคราะห์ โดยนำเอาสารประกอบจาก 2 ธาตุหรือหลาย ๆ ธาตุที่เรียกว่า Monomer มาทำปฏิกิริยาเชิงซ้อน (Polyreaction) ซึ่งประกอบด้วยขบวนการ Polymerisation ขบวนการ Polyaddition และขบวนการ Polycondensation ขนาดของมาโครโมเลกุลที่เกิดขึ้นจะมีขนาดแตกต่างกัน (บรรเลง ศรนิล. 2525)

2.9.3.1 พลาสติกที่ใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมจำแนกออกเป็น 2 ประเภท คือ

2.9.3.1.1 พลาสติกที่ได้จากสารพอลิเมอร์ในธรรมชาติ เช่น เนื้อไม้ เส้นใยธรรมชาติ (ฝ้ายและไหมเป็นต้น) โปรตีน และไบโอพอลิเมอร์

2.9.3.1.2 พลาสติกที่ได้จากพอลิเมอร์สังเคราะห์ ได้มาจากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรซ์ (polymerization) ของโมโนเมอร์ เช่น พอลิเอธิลีน พอลีสไตรีน และพอลิเอสเทอร์ เป็นต้น

พลาสติกที่ผลิตจากพอลิเมอร์ในธรรมชาติทุกชนิดสามารถย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ในขณะที่พลาสติกที่ผลิตได้จากพอลิเมอร์สังเคราะห์จำนวนมากมายหลายชนิดไม่สามารถย่อยสลายได้ พลาสติกที่มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถไฮโดรไลซ์ได้ เช่น อะลิฟาติก พอลิเอสเทอร์ พอลิเอไมด์ และพอลิยูรีเทน การสลายตัวของพลาสติอันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ (Microorganism) โดยเฉพาะแบคทีเรียและรา

สาเหตุที่พลาสติกที่ผลิตจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ พลาสติกที่ผลิตจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ได้จากน้ำมันปิโตรเลียมและมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากพอ เมื่อโซ่โมเลกุลมีขนาดยาวมาก ๆ ทำให้ความทนทานต่อการย่อยสลายโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี จากการค้นคว้าวิจัยของบริษัทยูเนียนคาร์ไบด์ได้นำพอลิเอธิลีนชนิดความหนาแน่นสูงที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 123,000 และมีน้ำหนักโมเลกุลลดลงมาเรื่อย ๆ มาทดสอบสมบัติการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์พบว่าพอลิเอธิลีนความ

หนาแน่นสูง ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ จะไม่สามารถย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้ พอลิเอธิลีนสามารถย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้เมื่อน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3200

พลาสติกที่ผลิตจากพอลิเมอร์สังเคราะห์มีสมบัติไม่ชอบน้ำ การซึมผ่านของความชื้นต่ำมีลักษณะเป็นรูพรุนและมีพื้นที่น้อย เนื่องจากในระหว่างการย่อยสลายโดยเชื้อจุลินทรีย์ทำให้พลาสติกมีขนาดเล็กลงโดยผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนให้เป็นสารชนิดอื่นต่อไป พลาสติกที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำและมีการซึมผ่านของความชื้นต่ำจะทำให้เอนไซมสัมผัสกับผิวหน้าของพลาสติกน้อยลง การที่พลาสติกไม่เป็นรูพรุนทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสยิ่งน้อยลงจึงย่อยสลายได้ยาก

2.9.3.2 พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ พลาสติกที่สามารถย่อยสลายตัวได้ในทางชีวภาพ (Biodrgradable plastics) มี 3 ลักษณะ คือ

การย่อยสลายทางชีวภาพ หมายถึง การย่อยสลายที่มาจากกิจกรรมทางชีวภาพโดยเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์ที่มาจากเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งการย่อยสลายนี้จะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีที่สำคัญ พลาสติกที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติเนื่องมาจากการกระทำของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียและรา เป็นต้น

2.9.3.2.1 พลาสติกไม่ได้เสื่อมสลายเนื่องจากจุลินทรีย์โดยตรง แต่ถูกจุลินทรีย์เข้าไปย่อยสลายสารเติมแต่งในส่วนอื่น ๆ ทำให้เหลือพลาสติกอยู่ในสภาพโครงสร้างรูพรุนและต่อไปก็จะกลายเป็นผงละเอียด

2.9.3.2.2 การเสื่อมสลายที่เกิดขึ้นเนื่องจากเปอร์ออกไซด์เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยตัวเอง (Auto oxidation) ซึ่งทำให้สายโซ่โมเลกุลของพลาสติกสลายตัวสั้นลง เพื่อให้จุลินทรีย์สลายตัวต่อเพื่อเปลี่ยนให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำต่อไป

2.9.3.2.3 การเสื่อมสลายเนื่องจากการกระทำของจุลินทรีย์โดยตรง นั่นคือจุลินทรีย์จะปล่อยเอนไซม์เพื่อทำการย่อยสลายพลาสติกประเภทนั้นได้โดยตรง เช่น พอลิคาร์โปร-แลคโตนและพอลิไฮดรอกซีบิวเรทอรีเรท เป็นต้น

2.9.3.3 พลาสติกที่สามารถสลายตัวได้โดยแสง (Photo degradable plastics)

เป็นพลาสติกที่สลายตัวได้เมื่อได้รับแสง ซึ่งพลาสติกชนิดนี้จะมีหมู่คาร์บอนิล เมื่อได้รับแสงอาทิตย์จะสามารถดูดกลืนแสงรังสีอัลตราไวโอเลต ทำให้สายโซ่โมเลกุลของพอลิเมอร์สลายตัว ดังนั้นถ้านำพลาสติกชนิดนี้ไปทิ้งไว้กลางแจ้งหลังจากการใช้งานแล้ว โดยปล่อยทิ้งไว้ให้โดนแสงอาทิตย์ พลาสติกชนิดนี้จะเสื่อมสลายและค่อย ๆ สลายตัวได้

2.9.3.4 พลาสติกที่สามารถสลายตัวด้วยวิธีอื่น ๆ

พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้โดยวิธีอื่นยังมีอีกมากมายหลายชนิดซึ่งจะยกตัวอย่างเพียงบางชนิดเท่านั้น เช่น พลาสติกที่สามารถสลายตัวได้โดยน้ำ พลาสติกที่สามารถสลายตัวทั้งทางชีวภาพและแสงเป็นต้น เนื่องจากพลาสติกสามารถสลายตัวได้ดังกล่าวเป็นสิ่งที่น่าสนใจเพราะการรวมเอาข้อดีของพลาสติกที่สามารถสลายตัวได้ในแต่ละวิธีเอาไว้ เช่น พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยเอโซอะโรมาติกและหมู่คีโตนไวต่อแสงในระหว่างการใช้งาน หมู่อะซิโตนที่ไวต่อแสงในระหว่างใช้งานหมู่เอโซจะช่วยป้องกันการสลายตัวเนื่องจากแสงและหลังจากการเลือกใช้งานแล้ว พลาสติกชนิดนี้จะถูกทิ้งไว้ในสภาพแวดล้อมทำให้หมู่เอโซถูกจุลินทรีย์เข้าทำลายและเหลือหมู่ที่สามารถสลายตัวเนื่องจากแสงดังนั้นเมื่อทิ้งไว้กลางแจ้งจะสามารถสลายตัวได้ต่อไป (ลลิดา บุญโฉม และวราภรณ์ พุทธัสสะ. 2540)

2.10 มุมมองในอนาคตของแบคทีเรียเซลลูโลส

การใช้ต้นไม้ในการผลิตกระดาษและในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ทำให้ป่าไม้ถูกทำลายมากขึ้น การรักษาป่าไม้เป็นสิ่งที่จำเป็นในการป้องกันสภาวะที่โลกร้อนขึ้นอันเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งยับยั้งได้โดยการดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์จากต้นไม้ แบคทีเรียเซลลูโลสเป็นทางเลือกเดียวที่มีอยู่ในการใช้เซลลูโลสจากแบคทีเรียแทนจากป่าไม้ เนื่องจากแบคทีเรียเซลลูโลสสามารถผลิตได้ในเวลาเพียง 2-3 วัน แต่ต้นไม้ต้องใช้เวลามากกว่า 30 ปีขึ้นไปในการเจริญเต็มที่ ซึ่งถือได้ว่าแบคทีเรียเซลลูโลสเป็น key material ในการป้องกันการร้อนขึ้นของโลกและเป็นการอนุรักษ์ธรรมชาติ (Production of biocellulose (bacterial cellulose). n.d.) [Internet, A]

เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่ามีแบคทีเรียไม่กี่สายพันธุ์ที่สามารถสังเคราะห์เซลลูโลสได้ที่รู้จักกันโดยทั่วไปคือ *A. xylinum* ใช้ในการสังเคราะห์เซลลูโลสแต่เชื้อนี้เจริญเติบโตช้าต้องการธาตุอาหารในการเจริญและต้องการออกซิเจนในการเจริญ แต่มีสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ใหม่ที่มีคุณสมบัติพิเศษ คือเจริญอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิต่ำและเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราคาถูกที่มีซูโครสเป็นองค์ประกอบสามารถเจริญได้สภาวะทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ข้อดีของสายพันธุ์นี้คือลดค่าใช้จ่ายในการผลิตและใช้เวลาในการผลิตได้อย่างรวดเร็วกว่าวิธีและสายพันธุ์ที่ใช้ในปัจจุบัน (New Cellulose-Producing Bacterium. n.d.) [Internet, E]

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัตถุดิบ

น้ำมะพร้าวแก่

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* DK ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. วราวุฒิ ครูส่ง สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก

3.3.1 ลวดแสตนเลส

3.3.2 ผ้าฝ้าย (cotton)

3.3.3 บวบแห้ง

3.3.4 ใยพลาสติก(ใช้ในตู้ปลา)

3.4 เครื่องมือที่ใช้ในการผลิต

	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
3.4.1 กล้องจุลทรรศน์	CH-30 RF200	Olympus	JAPAN
3.4.2 เครื่องปั่นละเอียด(Blender)	34BL99(8012)	Waring	U.S.A.
3.4.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง	รุ่น RO-5	Gerhardt	GERMANY
3.4.4 เครื่องชั่งน้ำหนักตำแหน่งหยาบ	Navigator	Ohaus Corporation	SWITZERLAND
3.4.5 เครื่องชั่งน้ำหนักตำแหน่งละเอียด	AB-204	Mettler Toledo	SWITZERLAND
3.4.6 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	SS-320	Tomy Seiko	JAPAN
3.4.7 เครื่องเขย่า		Gerhardt	BELGIUM
3.4.8 เครื่องผสม	G-560	Vortex Gene-2	U.S.A.

	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
3.4.9 ตู้อบลมร้อน		Binder	GERMANY
3.4.10 ตู้อบไมโครเวฟ	Type : Y71	Moulinex	France
3.4.11 ตู้ถ่ายเชื้อ			
3.4.12 ตู้เย็น	Thermotek		THAILAND
3.4.13 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	340	Mettler Toledo	SWITZERLAND
3.4.14 เครื่องวัดออกซิเจน	Oxygen Amplifier-170 Ingold		
		Mettler Toledo	SWITZERLAND
3.4.15 เครื่องวัดอัตราการให้อากาศ	NGIB 211	CP Platon	ENGLAND
3.4.16 ปั๊มลม	BB-7000	Swan	GERMANY
3.4.17 ถังหมักอะครีลิกขนาด 1.5 ลิตร และ 5 ลิตร			
3.4.18 ตัวกรองอากาศ (filter)			
3.4.19 สายยางซิลิโคนขนาดต่างๆ			

3.5 สารเคมี สารอาหาร

3.5.1 แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate)	Merck Co.,Ltd.
3.5.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodiumhydroxide)	Merck Co.,Ltd.
3.5.3 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(disodium hydrogen phosphate)	Merck Co.,Ltd.
3.5.4 กรดซิตริก (citric acid)	Merck Co.,Ltd.
3.5.5 กรดอะซิติก (acetic acid)	Merck Co.,Ltd.
3.5.6 ซูโครส	มิตรผล
3.5.7 กลูโคส (glucose)	Merck Co.,Ltd.
3.5.8 วุ้น (Agar)	SP Scientific

3.6 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.7 วิธีการดำเนินงาน

3.7.1 การศึกษาอัตราการให้อากาศ (aeration rate)

ทำการหมักในถังหมักอะคริลิกแบบ airlift ขนาด 2 ลิตร ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหารน้ำมะพร้าว (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ. 2535) 1350 มิลลิลิตร ใช้หัวเชื้อ 150 มิลลิลิตร *A. xylinum* DK (ซึ่งคิดเป็น 10% ของปริมาตรของน้ำหมัก) ให้อากาศโดยกรองผ่านตัวกรองอากาศ (filter) ใช้ rotameter วัดอัตราการไหล (aerationrate) ของอากาศ ปรับระดับอัตราการให้อากาศเป็น 5 ระดับ คือ 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 vvm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยในแต่ละซ้ำของการหมักใช้หัวเชื้อครั้งเดียวกัน และใช้อาหารน้ำมะพร้าวที่เตรียมครั้งเดียวกัน ทำการหมักในแต่ละซ้ำ 5 ถัง ถังที่ 1 ให้อากาศ 0.1 vvm ถังที่ 2 ให้อากาศ 0.5 vvm ถังที่ 3 ให้อากาศ 1.0 vvm ถังที่ 4 ให้อากาศ 1.5 vvm ถังที่ 5 ให้อากาศ 2.0 vvm ระยะเวลาในการหมัก 7 วัน

ติดตามผลการทดลอง ที่ระยะเวลาการหมัก 0 1 3 5 7 วัน โดยวิธี

- นับจำนวนเซลล์ในน้ำหมัก(viable Cell) ตามวิธีของ Krusong *et al.*(1998a)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)ที่เหลือ โดยวิธี Shaffer-Somogyi Micro Method (AOAC.1995)
- ค่า pH โดยใช้ pH meter
- ค่า DO โดยใช้เครื่องวัดออกซิเจน

หลังจากทำการหมักครบ 7 วัน นำวุ้นเซลลูโลสที่ได้มาวิเคราะห์

- ปริมาณเซลลูโลส(cellulose content) Krusong *et al.*(1995)
- ปริมาณเซลล์(cell content) ตามวิธีของ Krusong *et al.*(1995)

เพื่อเลือกสภาวะการให้อากาศที่เหมาะสมในการหมักที่ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงที่สุด เพื่อใช้ศึกษาในหัวข้อต่อไป

3.7.2 การคัดเลือก SCMA matrix

ทำการหมักเหมือนกับข้อ 3.7.1 แต่มีการตรึงเซลล์โดยใช้ SCMA matrix โดยใช้อัตราการให้อากาศที่ได้จากหัวข้อ 3.7.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ผ้าฝ้าย ใยบวบ และใยพลาสติก เป็น SCMA matrix เปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่ใช้ SCMA matrix เพื่อเลือกสภาวะที่ให้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด วิธีการหมักทำได้โดยถังที่ 1 เป็นตัวควบคุมไม่ใช้ SCMA matrix ถังที่ 2 ใช้ผ้าฝ้ายเป็น SCMA matrix ถังที่ 3 ใช้บวบเป็น SCMA matrix ถังที่ 4 ใช้พลาสติกเป็น SCMA matrix ใช้วิธีติดตามผลการทดลอง เหมือนข้อ 3.7.1 ที่ระยะเวลา 0 4 8 12 16 20 24 72 120 168 ชั่วโมง

การเตรียม SCMA matrix ประกอบด้วย ผ้าฝ้าย ใยบวบ และใยพลาสติก โดยในกรณีของผ้าฝ้าย ใช้ผ้าฝ้ายเย็บติดกับขอบลวดแสตนเลส เส้นผ่าศูนย์กลางของขอบลวดแสตนเลสเท่ากับ 5 เซนติเมตร วาง SCMA matrix ไว้ที่ระดับกึ่งกลางของน้ำหมัก ส่วนในกรณีของใยบวบ และใยพลาสติก เย็บติดกับโครงลวดแสตนเลสในลักษณะเดียวกัน ก่อนใช้นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.7.3 ปัจจัยในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK โดยใช้ SCMA matrix ที่เหมาะสม

3.7.3.1 ศึกษาระดับความสูงของ SCMA matrix

ทำการหมักโดยใช้ SCMA matrix ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว โดยให้ระดับความสูงของ SCMA matrix ในถังหมักต่างกัน โดยกำหนดให้ระดับความสูงจากท่อให้อากาศเป็น 1 นิ้ว 3 นิ้ว 5 นิ้ว เปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่ใช้ระดับความสูงของ SCMA matrix เหมือนกับข้อ 3.7.2 โดยใช้อัตราการให้อากาศเท่ากันทุกถังจากการศึกษาที่ผ่านมา

ทำการหมักโดย ถังที่ 1 เป็นตัวควบคุมที่ให้ SCMA matrix อยู่ระดับกึ่งกลางถังหมัก ถังที่ 2 ให้ SCMA matrix สูงจากท่อให้อากาศ 1 นิ้ว ถังที่ 3 ให้ SCMA matrix สูงจากท่อให้อากาศ 3 นิ้ว ถังที่ 4 ให้ SCMA matrix สูงจากท่อให้อากาศ 5 นิ้ว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ติดตามผลการทดลองเหมือนหัวข้อที่ผ่านมาที่ระยะเวลา 0 1 3 5 7 วัน

3.7.3.2 จำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้นของ SCMA Matrix

ทำการหมักเหมือนในหัวข้อ 3.7.3.1 แต่ใช้ความสูงในการวาง SCMA matrix ที่ได้จากข้อ 3.7.3.1 ทำการหมักเพื่อหาจำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้นของ SCMA matrix ที่เหมาะสม

วิธีการทำ SCMA matrix 2 ชั้น ทำได้โดยใช้ผ้าฝ้ายเย็บติดกับโครงลวดแสตนเลสซึ่งมีลักษณะเป็นวงกลม 2 ชั้น ชั้นล่างเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ชั้นบนเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ในกรณีของ SCMA matrix 3 ชั้น ทำในลักษณะเดียวกันกับ 2 ชั้นแต่เพิ่มโครงลวดแสตนเลสอีก 1 ชั้น โดยชั้นล่างเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร ชั้นที่สองเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ชั้นบนเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตรแล้วเย็บผ้าฝ้ายเย็บติดกับโครงลวด

วิธีการหมัก ถังที่ 1 เป็นตัวควบคุมที่ใช้ SCMA matrix ชั้นเดียว จากหัวข้อ3.7.3.1 ถังที่ 2 ใช้ SCMA matrix จำนวนชั้น 2 ชั้น ระยะห่างระหว่างชั้นห่างกัน 2 นิ้ว ถังที่ 3 ใช้ SCMA matrix จำนวนชั้น 2 ชั้น ระยะห่างระหว่างชั้นห่างกัน 3 นิ้ว ถังที่ 4 ใช้ SCMA matrix จำนวนชั้น 3 ชั้น ระยะ

ห่างระหว่างชั้นห่างกัน 2 นิ้ว ถังที่ 5 ใช้ SCMA matrix จำนวนชั้น 3 ชั้น ระยะห่างระหว่างชั้นห่างกัน 3 นิ้ว ตำแหน่งที่วางของ SCMA matrix ได้จากหัวข้อ 3.7.3.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ติดตามผลการทดลองดังหัวข้อที่ผ่านมา ที่ระยะเวลาการหมัก 0 1 3 5 7 วัน

3.7.4 ศึกษาการใช้ SCMA Matrix ในการตรึงเซลล์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักในลักษณะ Repeated Batch

ทำการหมักแบบ repeated batch รอบละ 5 วัน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดมาใช้ เมื่อหมักครบ 5 วันเก็บเกี่ยวเซลลูโลส (นับเป็นรอบแรกของการหมัก) เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าไปใหม่ให้ปริมาตรเท่ากับ 1500 มิลลิลิตร หมักต่อไปอีก 5 วัน เพื่อศึกษาว่าสามารถใช้ SCMA matrix ในการตรึงเซลล์เพื่อเป็นหัวเชื้อสามารถหมักติดต่อกันได้กี่ครั้ง ติดตามผลการทดลองเหมือนข้อที่ผ่านมา ที่ 0 1 3 5 วันของการหมักแต่ละรอบ

3.7.5 ศึกษาการขยายขนาดการหมักเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK

เนื่องจากปริมาตรน้ำหมักและขนาดของถังหมักเพิ่มสูงขึ้น SCMA matrix ที่ใช้จึงเพิ่มจำนวนชั้นเป็น 4 ชั้น ระยะห่างระหว่างชั้น 2 นิ้ว ชั้นล่างห่างจากท่อให้อากาศ 1 นิ้ว เส้นผ่าศูนย์กลางของโครงลวดแสตนเลสชั้นล่างเป็น 6 เซนติเมตร ชั้นที่สองเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร ชั้นที่สามเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร ชั้นบนสุดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

ทำการหมักแบบ Repeated batch รอบละ 5 วัน ใช้ถังหมักขนาด 7 ลิตร ปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร โดยใช้สภาวะของการหมักเหมือนกับหัวข้อ 3.7.4 เมื่อหมักครบ 5 วันนำไปเก็บเกี่ยวเซลลูโลส (นับเป็นรอบแรกของการหมัก) เติมน้ำหมักเข้าไปใหม่ให้ปริมาตรเท่ากับ 5 ลิตร หมักต่อไปอีก 5 วัน เพื่อศึกษาว่าสามารถใช้ SCMA matrix ในการตรึงเซลล์เพื่อเป็นหัวเชื้อสามารถหมักติดต่อกันได้กี่ครั้ง ติดตามผลการทดลองเหมือนข้อ 3.7.4 ที่ 0 1 3 5 วันของแต่ละรอบ

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS Version 7.5 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของผลการทดลอง โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เพื่อเลือกสภาวะที่ให้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด

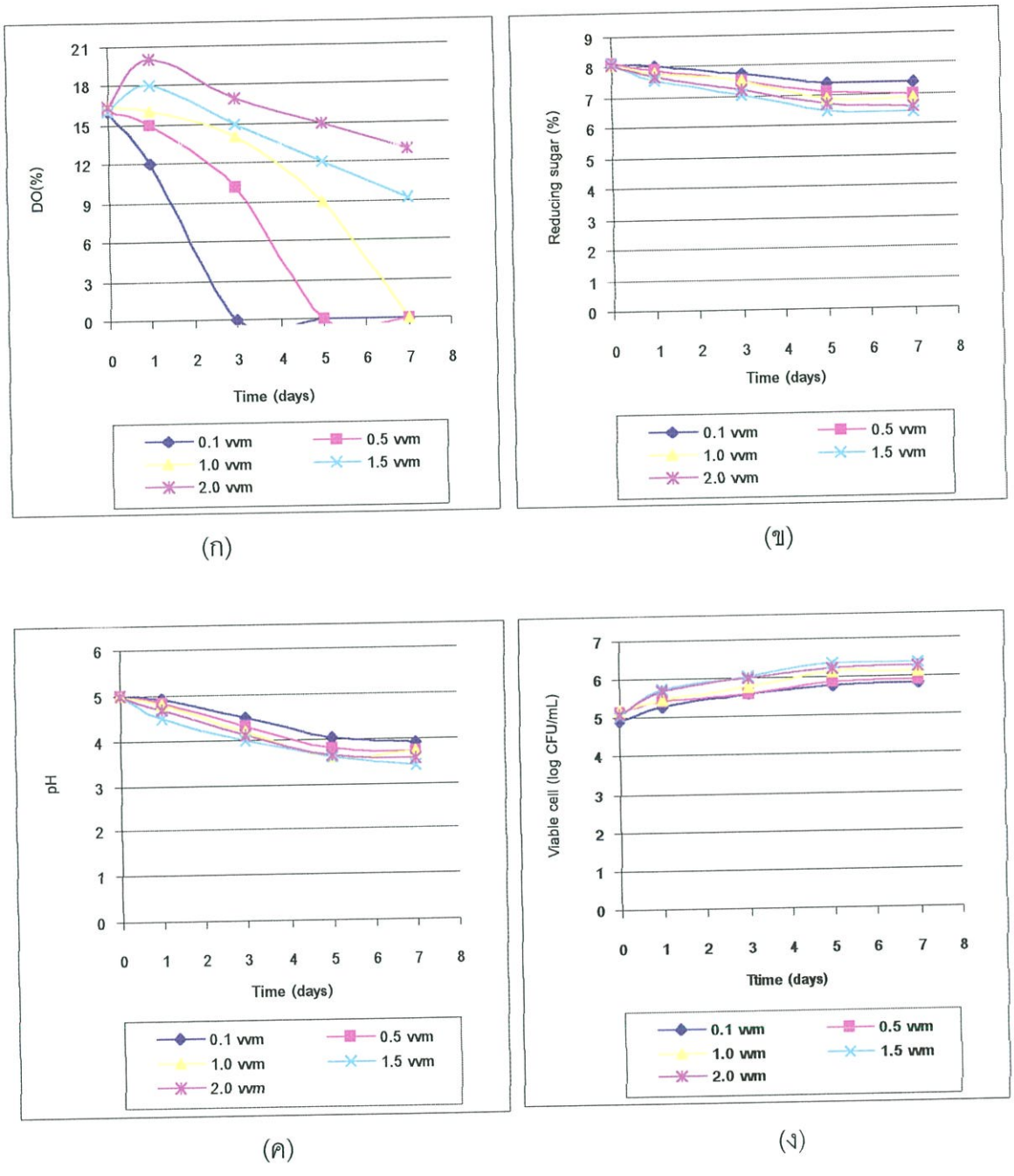
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการทดลองนี้เลือกใช้เชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK เนื่องจากเชื้อนี้มีลักษณะเนื้อวุ้นเซลลูโลสที่เหนียว เกาะตัวกันเป็นกลุ่มก้อน เนื้อวุ้นเซลลูโลสไม่กระจายตัวเมื่อเลี้ยงในถังหมักแบบ airlift เจริญเติบโตได้ดีและให้ปริมาณเซลลูโลสที่สูง

อาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองเลือกอาหารน้ำมะพร้าว (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ. 2535) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK สามารถเจริญได้ในอาหาร coconut water มากกว่าในอาหารสังเคราะห์ และให้ปริมาณเซลลูโลสที่สูงกว่าสูตรอาหาร Hestrin and Schramm (1954) เพราะเป็นแหล่งอาหารจากธรรมชาติ (ลำพึง พุ่มจันทร์. 2545) และสอดคล้องกับรายงานของ Toyosaki *et al.* (1995) ที่พบว่าการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* ให้ได้ปริมาณมาก ขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าวนั้นมีสารอาหารที่สมบูรณ์ทำให้ไม่ต้องเติมสารอาหารอื่นอีก (สุเมธ ตันตระเธียร. 2537)

ในการปรับ pH เริ่มต้นของอาหารน้ำมะพร้าวเท่ากับ 5.0 (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ. 2535) สอดคล้องกับรายงานของ Verchuren *et al.* (2000) ที่ทำการหมักเซลลูโลสโดยใช้น้ำมะพร้าวเติมซูโครสเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า pH 4.0 และ 5.0 เชื้อสร้างเซลลูโลสได้สูงที่สุดและในรายงานของวราวุฒิ ครูส่ง และคณะ (2539ก) ได้เติมน้ำตาลลงในน้ำมะพร้าวในการผลิตวุ้นมะพร้าวเนื่องจากปริมาณของน้ำตาลในน้ำมะพร้าวไม่แน่นอนและเพื่อให้แน่ใจว่ามีปริมาณคาร์บอนมากพอสำหรับการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นของเชื้อ ในสูตรอาหารน้ำมะพร้าวมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.9 ถึงแม้ว่าในน้ำมะพร้าวจะมีสารประกอบไนโตรเจนในรูปของโปรตีนอยู่ประมาณร้อยละ 0.4 แต่การเติมสารประกอบไนโตรเจนลงไปในการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว เพื่อช่วยเร่งให้เชื้อสร้างแผ่นวุ้นได้หนาในระยะเวลาสั้นและช่วยเชื้อเจริญได้ดี

สำหรับระยะเวลาในการหมักเซลลูโลสจากเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ลำพึง พุ่มจันทร์ (2545) พบว่าช่วงระยะเวลาวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 ของการหมัก เชื้อ *A. xylinum* DK มีการเจริญรวดเร็วและสามารถสร้างเซลลูโลสเป็นแผ่นวุ้นลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลวได้ปริมาณมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hestrin and Schramm (1954) และเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการที่จะนำไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น (starter) ในการทดลอง หลังจากวันที่ 7 ของการหมักพบว่าเชื้อมีการเจริญลดลงจะเห็นได้จากปริมาณเซลล์ลดลงและเซลลูโลสที่สร้างขึ้นนั้นค่อนข้างคงที่ ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาในการ



ภาพที่ 4.1 ผลของอากาศที่ระดับอัตราการให้อากาศ 0.1-2.0 vvm ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ต่อการเปลี่ยนแปลงของ :

(ก) ค่า DO (ข) น้ำตาลรีดิวซ์

(ค) ค่า pH (ง) จำนวนเซลล์ในน้ำหมัก

จากตารางที่ 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ เมื่อทำการหมักครบ 7 วัน ที่อัตราการให้อากาศต่างกัน พบว่าที่อัตราการให้อากาศ 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 vvm ให้ปริมาณเซลลูโลส 0.085 0.35 0.68 1.22 และ 0.95 g dry wt/L ตามลำดับ และให้ปริมาณเซลล์ 0.04 0.15 0.29 0.59 และ 0.45 g dry wt/L ตามลำดับ ทั้งปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าปริมาณอากาศมีผลต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK

ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* DK พบว่าที่อัตราการให้อากาศในช่วง 0.1-1.5 vvm จำนวนเซลล์ (viable cell) เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาของการหมักเพิ่มขึ้น เมื่อทำการหมักครบ 7 วัน ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm มีจำนวนเซลล์มากที่สุด ดังนั้นอัตราการให้อากาศที่ 1.5 vvm เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ดังแสดงในภาพที่ 4.1

ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm ให้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุดและปริมาณเซลล์สูงสุดด้วย โดยมีปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.22 g dry wt/L และ 0.59 g dry wt/L ตามลำดับ พบว่าการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ที่เชื้อสร้างขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ishikawa *et al.* (1995) และ Kouda *et al.* (1998) ที่พบว่าการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* ขึ้นกับการเจริญของเชื้อ เมื่อเชื้อเจริญได้ดีและมีปริมาณมากขึ้น ก็จะสามารถสร้างเซลลูโลสได้เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย และได้ผลเช่นเดียวกับรายงานของ Hestrin snd Schramm (1954) ที่ระบุว่าการสร้างเซลลูโลสในวุ้นเซลลูโลสมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่อยู่ในวุ้นเซลลูโลสนั้น ดังนั้นในสภาวะการให้อากาศ 1.5 vvm ให้ปริมาณเซลล์สูงที่สุด จึงทำให้ได้ปริมาณเซลลูโลสในปริมาณที่สูงที่สุด และที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm มีจำนวนเซลล์มากที่สุดด้วย ดังนั้นอัตราการให้อากาศ 1.5 vvm จึงเหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรีย *A. xylinum* DK

จากตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1 ที่อัตราการให้อากาศ 2.0 vvm ให้ปริมาณเซลลูโลส ปริมาณเซลล์ และจำนวนเซลล์ ต่ำกว่าอัตราการให้อากาศที่ 1.5 vvm เนื่องจากปริมาณอากาศที่ให้มากเกินไปส่งผลให้เกิดผลกระทบในด้านลบ (negative effect) คือปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมากเกินไปเนื่องจากมีอากาศมากเกินไปในระบบ มีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ ทำให้เชื้อสร้างเซลลูโลสลดลงส่งผลให้เซลลูโลสที่สร้างจากเชื้อ *A. xylinum* มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Joris *et al.* (1993) และ Hestrin and Schramm (1954) พบว่าที่การเขย่า หรือการกวน หรือการให้อากาศระหว่างการสร้างวุ้นเซลลูโลสพบว่าปริมาณเชื้อ *A. xylinum* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่การสร้างเซลลูโลสลดลงหรือไม่สร้างเนื่องจากมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำสูง ทำให้การสร้างวุ้น

เซลลูโลสที่ได้มีปริมาณที่ต่ำ (negative effect) ประกอบกับที่อัตราการให้อากาศ 2.0 vvm ทำให้น้ำหมักเคลื่อนที่ขึ้นลงตามความแรงของการให้อากาศ ทำให้เชื้อเกาะตัวกันได้ช้า เจริญได้ไม่ดี ทำให้มีผลต่อการสร้างเซลลูโลส

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวซ์ ค่า pH และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักของการหมักเซลลูโลสที่ระยะเวลา 0 1 3 5 7 วัน พบว่ามีความสัมพันธ์กันดังแสดงในภาพที่ 4.1 โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่า pH และปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำหมักลดลงในขณะที่จำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นเนื่องมาจากขณะที่ *A. xylinum* DK เจริญจะใช้น้ำตาลและอากาศในการเจริญเติบโตและสังเคราะห์เซลลูโลสรวมทั้งสร้างกรดออกมาในระหว่างกระบวนการหมักมีผลทำให้ค่า pH ลดลง

จากการสังเกตการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* DK ในการหมักเซลลูโลสโดยใช้ถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร พบว่าเชื้อจะสร้างเซลลูโลสจากทางด้านล่างของถังหมักก่อนโดยจะเจริญหุ้มหัวพ่นอากาศ แล้วจึงเจริญออกมาภายในถังหมัก ทั้งนี้เนื่องจากหลักการทำงานของถังหมักแบบ airlift อาศัยความแตกต่างของความถ่วงจำเพาะของของเหลวเมื่อมีอากาศผสมอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน การส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่ของเหลวในถังหมักจะเกิดขึ้นเนื่องจากแรงดันของของเหลวภายในถังหมักโดยจะเกิดมากที่สุดที่บริเวณฐานของถังหมัก (สมใจ ศิริโภค. 2537) ทำให้เชื้อเจริญจากด้านล่างของถังหมักเนื่องจากมีอากาศอยู่เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อ ในอัตราการให้อากาศน้อย ๆ ที่ 0.1 และ 0.5 vvm พบว่าเชื้อจะสานเส้นใยกันอย่างเบาบาง เมื่อทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสจะพบว่าลักษณะเนื้อสัมผัสของเซลลูโลสนิ่ม เส้นใยสานตัวกันแบบไม่แน่น ทั้งนี้สังเกตได้จากในวันแรกของการเจริญถ้าหากให้อัตราการให้อากาศน้อยเชื้อจะสานเส้นใยกันแบบเบาบางทั่วทั้งถังหมัก เมื่อให้อัตราการให้อากาศเพิ่มมากขึ้นเชื้อจะสร้างเซลลูโลสได้เร็วขึ้นและสานตัวกันอย่างหนาแน่นขึ้นโดยจะเกาะตัวอยู่ที่ด้านล่างของถังหมักซึ่งติดกับท่อให้อากาศก่อนแล้วจึงเจริญต่อออกมาในถังหมักทำให้ได้ปริมาณเซลลูโลสสูงกว่าการให้อัตราการให้อากาศน้อย การจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนของวุ้นเซลลูโลสจะเริ่มจากด้านล่างของถังหมักและเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มมากขึ้นวุ้นเซลลูโลสจะค่อย ๆ เพิ่มปริมาณและความหนาแน่นขึ้นจากด้านล่างขึ้นสู่ด้านบนของถังหมัก โดยพบว่ายิ่งใกล้หัวพ่นอากาศมากขึ้นเท่าใดเซลลูโลสยิ่งจับตัวกันแน่นมากขึ้นเท่านั้น ยิ่งห่างจากหัวพ่นอากาศมากเท่าใดเซลลูโลสยิ่งสานตัวกันเบาบางลงตามลำดับ จากการทดลองที่อัตราการให้อากาศ 0.1 vvm และ 0.5 vvm เชื้อจะเจริญอย่างช้าๆ และสร้างเซลลูโลสโดยเส้นใยสานตัวอย่างหลวม ๆ กระจายตัวทั่วน้ำหมัก เมื่อทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสพบว่าลักษณะของวุ้นเซลลูโลสที่ได้จะเละ นิ่ม ไม่เกาะตัวกันเป็นกลุ่มก้อน จากผลการทดลองที่ได้ลักษณะของวุ้นเซลลูโลสจาก *A. xylinum* DK สอดคล้องกับรายงานของ Watanabe *et al.* (1995) ซึ่งทำการหมักเซลลูโลสในสภาวะนิ่ง โดยศึกษาว่า oxygen tension ใน

gaseous phase ของเชื้อ *A. xylinum* พบว่าที่ oxygen tension สูง เจลเซลลูโลสแข็งแรงกว่า (harder membrane) ในสภาวะ oxygen tension ต่ำ ซึ่งจะได้ลักษณะเซลลูโลสที่อ่อน (softer membrane) และพบว่าปริมาณเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้นเมื่อ oxygen tension ใน gaseous phase เพิ่ม

เนื่องจาก *A. xylinum* เป็น strictly obligate aerobic ซึ่งมีความสามารถในการสร้างเซลลูโลสในสภาวะที่ให้อากาศที่ 0.1-0.5 vvm อากาศอาจจะไม่เพียงพอต่อการเจริญทำให้สร้างเซลลูโลสได้น้อยและในสภาวะที่ไม่มีอากาศพบว่าเชื้อจะไม่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ ดังนั้นการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อปริมาณออกซิเจนมีเพียงพอต่อความต้องการของเซลล์เท่านั้น (วราวุฒิ ครูส่ง และ กรวิกา สุขศรีวงษ์. 2539ข) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Kouda *et al.* (1997) ที่เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ให้อากาศในถังหมักขนาด 50 ลิตร พบว่าอัตราการผลิตเซลลูโลส (production rate) ขึ้นกับ oxygen transfer rate

จากการสังเกตการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* DK พบว่าอัตราการให้อากาศในช่วงวันแรกของการหมักสำคัญมากที่สุดต่อการสร้างเซลลูโลสและการสานตัวกันให้มีความหนาแน่น เนื่องจากถ้าอัตราการให้อากาศน้อยเชื้อจะสร้างเซลลูโลสและสานตัวกันอย่างเบาบาง เมื่อเชื้อสานตัวกันเป็นร่างแหอย่างเบาบางแล้วถึงแม้จะให้อากาศเพิ่มในวันต่อไปเชื้อก็จะไม่สามารถสร้างเส้นใยเซลลูโลสแทรกเข้าไปในเส้นใยที่สานตัวกันเป็นร่างแหขึ้นมาแล้วได้

4.2 ผลการคัดเลือก SCMA matrix

จากการหมักวุ้นเซลลูโลสในสภาวะของการให้อากาศที่ศึกษาไว้แล้ว พบว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงที่สุด จึงใช้ในการศึกษาผลของการคัดเลือก SCMA matrix ทำการหมักโดยใช้ผ้าฝ้าย ใยบวบ และใยพลาสติก เป็น SCMA matrix ให้เชื้อยึดเกาะ โดยอยู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางของน้ำหมักเทียบกับการหมักโดยไม่ใช้ SCMA matrix เป็นตัวควบคุม เพื่อเปรียบเทียบว่าการหมักวุ้นเซลลูโลสโดยการใช้ SCMA matrix และชนิดของ SCMA matrix มีผลต่อปริมาณเซลลูโลสที่เชื้อสร้างและเชื้อสามารถสร้างเซลลูโลสได้มากกว่าการไม่ใช้ SCMA matrix

จากตารางที่ 4.2 ผลของปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์เมื่อใช้ SCMA matrix ต่างชนิดกัน พบว่าการใช้ผ้าฝ้ายเป็น SCMA matrix ให้เชื้อยึดเกาะให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์มากที่สุด คือ 1.50 และ 0.75 g dry wt/L ตามลำดับ ในขณะที่ใยบวบ ให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์เป็น 1.29 และ 0.62 g dry wt/Lตามลำดับ ใยพลาสติกให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์เป็น 1.36 และ 0.69 g dry wt/L ตามลำดับ ทั้งปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์จากทุกสภาวะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.2 ผลของการใช้ ผ้าฝ้าย ใยบวบ และใยพลาสติก เป็น SCMA matrix ต่อปริมาณเซลลูโลส และปริมาณเซลล์ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

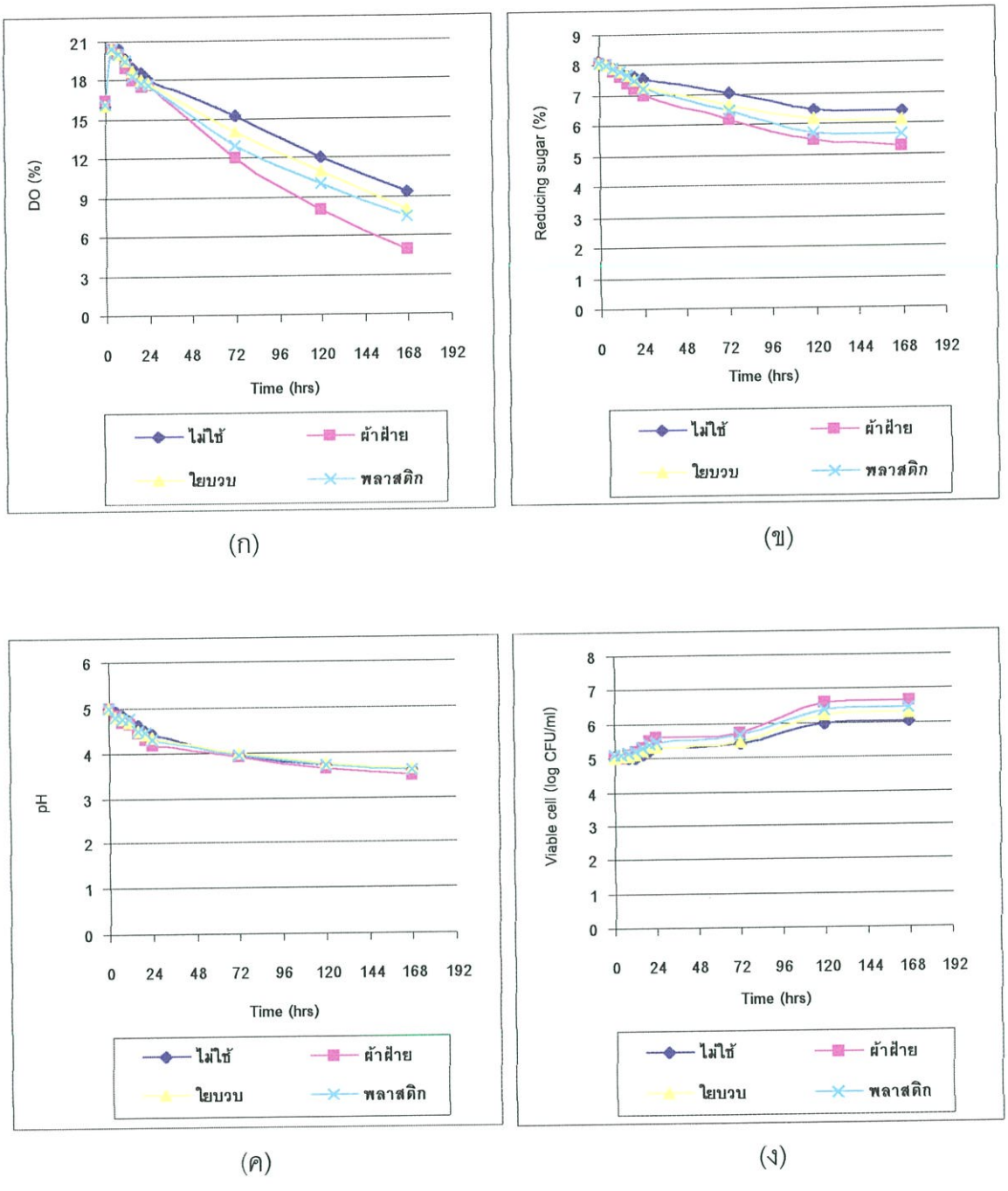
ชนิด SCMA Matrix	ปริมาณเซลลูโลส (cellulose content, g dry wt/L)	ปริมาณเซลล์ (cell content, g dry wt/L)
ไม่ใช้ SCMA matrix	1.19 ± 0.02^{d}	0.55 ± 0.03^{d}
ผ้าฝ้าย (cotton)	1.50 ± 0.07^{a}	0.75 ± 0.01^{a}
ใยบวบ	1.29 ± 0.01^{c}	0.62 ± 0.03^{c}
ใยพลาสติก	1.36 ± 0.02^{b}	0.69 ± 0.05^{b}

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาตาม DMRT

ภาพที่ 4.2 (ก) และภาพที่ 4.2 (ข) แสดงค่า DO กับค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในทุกสภาวะการหมัก พบว่าในสภาวะที่ใช้ผ้าฝ้ายเป็น SCMA Matrix ค่า DO กับน้ำตาลรีดิวซ์ เหลืออยู่น้อยที่สุด รองลงมาคือ ใยพลาสติก ใยบวบ ผ้าฝ้ายเป็น SCMA matrix ให้เชื้อยึดเกาะมีการใช้อากาศกับน้ำตาลในการเจริญและการสร้างเซลลูโลสมากกว่าใยบวบและพลาสติกซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างเซลลูโลส พบว่าผ้าฝ้ายให้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด รองลงมาเป็นใยพลาสติกและอันดับสุดท้ายเป็นใยบวบ

ภาพที่ 4.2 (ค) แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการหมัก พบว่าค่า pH มีความสัมพันธ์ต่อการสร้างเซลลูโลสน้อย โดยในทุกสภาวะของการหมักค่า pH ต่างกันน้อยและ pH ลดลงเนื่องจากเชื้อมีการสร้างกรดออกมาในระหว่างกระบวนการหมัก

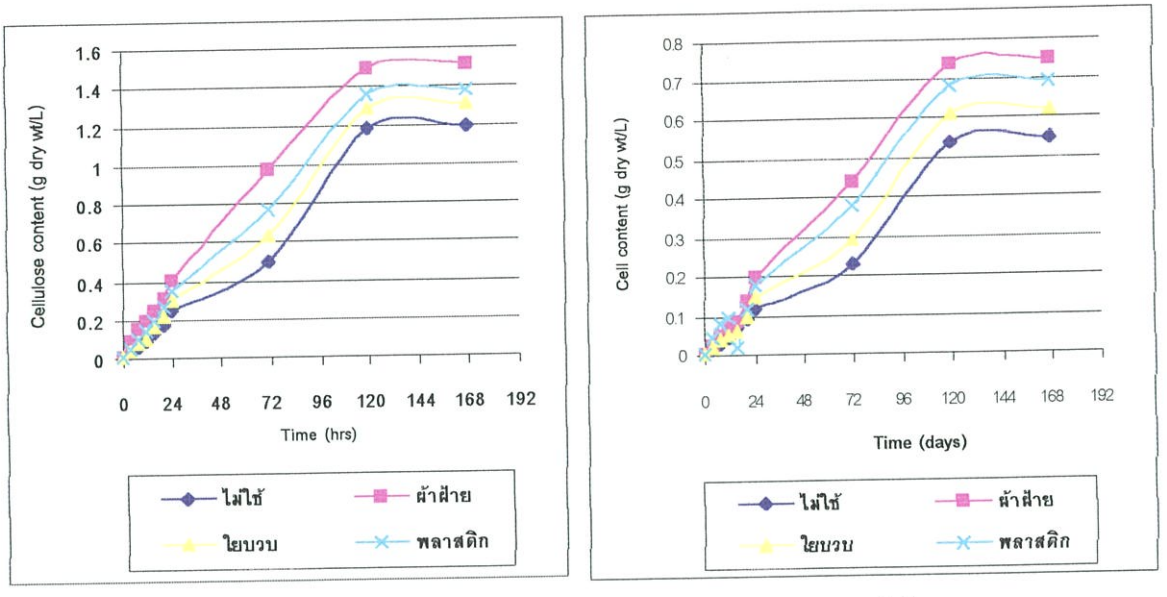
จากภาพที่ 4.2(ง) (จ) (ฉ) แสดงการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ในน้ำหมัก ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ตามลำดับ จากผลการทดลองในการหมักที่ใช้ผ้าฝ้ายให้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุดซึ่งสอดคล้องกับค่าของจำนวนเซลล์ในน้ำหมักและปริมาณเซลล์ที่มีค่ามากที่สุดด้วยแสดงให้เห็นว่าปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์มีความสัมพันธ์กัน เมื่อปริมาณเซลล์สูงทำให้ได้เซลลูโลสในปริมาณที่สูงขึ้นด้วย การสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* ขึ้นกับการเจริญของเชื้อเมื่อเชื้อเจริญได้ดีและมีปริมาณมากขึ้นก็จะสามารถสร้างเซลลูโลสได้เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (Ishikawa *et al.* 1995 ; Kouda *et al.* 1998)



ภาพที่ 4.2 ผลของ SCMA matrix ชนิดต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตรเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ต่อการเปลี่ยนแปลงของ :

(ก) ค่า DO (ข) น้ำตาลรีดิวซ์

(ค) ค่า pH (ง) จำนวนเซลล์ในน้ำหมัก



(จ) (ฉ)

ภาพที่ 4.2 (ต่อ) ผลของ SCMA matrix ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ต่อการเปลี่ยนแปลงของ :

(จ) ปริมาณเซลลูโลส (ฉ) ปริมาณเซลล์

ลักษณะการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* DK เมื่อให้อากาศในระบบ อากาศจะออกจากท่อให้อากาศแล้วกระทบกับ SCMA matrix แล้วออกทางด้านข้าง เชื้อเจริญโดยจะสร้างเซลลูโลสห่อหุ้ม SCMA matrix และลักษณะเส้นใยของวุ้นเซลลูโลสที่ได้ไม่สานตัวกันเป็นแผ่นแต่จะเจริญรอบ SCMA matrix โดยเซลลูโลสจะห่อหุ้ม SCMA matrix จากการสังเกตพบว่าลักษณะของวุ้นเซลลูโลสที่ห่อหุ้ม SCMA matrix จะสานตัวกันแน่นมากโดยการสานตัวกันจะเริ่มเบาบางลงเมื่อการห่อหุ้ม SCMA matrix หนามากขึ้นเรื่อย ๆ หรือยิ่งห่างจาก SCMA matrix วุ้นเซลลูโลสจะสานตัวกันอย่างเหนียวแน่นน้อยลง จากภาพที่ 4.2 (จ) พบว่าในกรณีที่ใช้ SCMA matrix เชื้อสามารถสร้างเส้นใย microfibril ได้เร็วกว่าไม่ใช้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Krusong *et al.* (2001) ได้พัฒนากระบวนการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* DK โดยใช้ SCMA matrix ให้เชื้อยึดเกาะในสภาวะเขย่าโดยเรียกกระบวนการนี้ว่า static cellulose microfibril attachment (SCMA) matrix process เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตเซลลูโลสต่อไป จากการทดลองพบว่าเชื้อ *A. xylinum* DK สามารถสร้างเส้นใย microfibril ได้เร็วกว่าการไม่ใช้ matrix เมื่อเทียบกับตัวควบคุมและพบว่า Stainless steel screen มีความเหมาะสมที่สุดในการใช้เป็น

SCMA Matrix โดยเชื้อจะสร้างเซลลูโลสรอบ ๆ matrix โดยลักษณะของเซลลูโลสที่เชื้อสร้างไม่มีลักษณะที่เป็นแผ่น (no pellet forming)

ลักษณะการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* DK เมื่อใช้ผ้าฝ้าย ใยบวบ ใยพลาสติก เป็น SCMA matrix ให้เชื้อยึดเกาะ การที่ผ้าฝ้ายให้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุดอาจจะเนื่องมาจากผ้าฝ้ายเป็นวัสดุที่มีส่วนประกอบเป็นเซลลูโลสมากที่สุดในวัสดุทั้ง 3 ชนิดนี้ โดยมีส่วนประกอบเป็นเซลลูโลสถึง 94% (กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2527) ประกอบกับผ้าฝ้ายไม่มีช่องว่างระหว่างเส้นใย ทำให้เชื้อสามารถยึดเกาะได้เร็วกว่า มากกว่าและดีกว่า เมื่อเชื้อยึดเกาะกับ SCMA matrix ได้แล้ว เชื้อจะเจริญและสร้างเซลลูโลสโดยสานตัวเป็นร่างแห (network) อย่างรวดเร็ว ทำให้อัตราการสร้างเซลลูโลสสูงกว่าตัวควบคุม และได้ปริมาณเซลลูโลสสูงดังแสดงในตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.2(จ) กรณีของใยบวบที่มีลักษณะเส้นใยพันกันไปมา (ธรณิศวร์ พิรุณละออง. 2545) [Internet] แข็ง แห้ง กระด้างกว่าผ้าฝ้าย ช่องว่างระหว่างใยบวบห่างกันมากกว่าผ้าฝ้ายทำให้ไม่เหมาะสมต่อเชื้อทำให้เชื้อเกาะตัวได้ช้ากว่าผ้าฝ้าย ทำให้อัตราการสร้างเซลลูโลสน้อยกว่าผ้าฝ้ายทำให้ได้ปริมาณเซลลูโลสน้อยที่สุดในวัสดุทั้ง 3 ชนิดนี้ ลักษณะของใยพลาสติกที่ใช้ก็เป็นในลักษณะเดียวกับบวบทำให้การเจริญและการสร้างเซลลูโลสไม่ดีเท่าที่ควร แต่ปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากใยพลาสติกสูงกว่าใยบวบเนื่องจากช่องว่างระหว่างใยพลาสติกน้อยกว่าของใยบวบทำให้มีพื้นที่ในการยึดเกาะมากกว่าใยบวบ

4.3 ผลการศึกษาปัจจัยในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อแบคทีรีย *A. xylinum* DK โดยใช้ SCMA matrix ที่เหมาะสม

4.3.1 ผลการศึกษาการเลือกระดับความสูงของ SCMA matrix

ทำการหมักโดยใช้ผ้าฝ้าย เป็น SCMA matrix จากการทดลองที่ผ่านมา ให้ปริมาณอากาศ 1.5 vvm ในการศึกษาเพื่อหาตำแหน่งในการวางตำแหน่งของ SCMA matrix ที่ให้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด โดยวัดความสูงจากท่อให้อากาศในการกำหนดจุดวางตำแหน่งของ SCMA matrix สูงจากท่อให้อากาศ 1 นิ้ว 3 นิ้ว และ 5 นิ้ว และใช้ผ้าฝ้ายเป็น SCMA matrix เทียบกับตัวควบคุมที่ใช้ผ้าฝ้ายและใช้ระดับตำแหน่งความสูงของ SCMA matrix จากข้อ 4.2

จากตารางที่ 4.3 ตัวควบคุมให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ 1.50 และ 0.75 g dry wt/L สภาวะที่ใช้ SCMA matrix สูงจากท่อให้อากาศ 1 นิ้วให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์มากที่สุด 1.62 และ 0.99 g dry wt/L ความสูงจากท่อให้อากาศ 3 นิ้วให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ 1.48 และ 0.78 g dry wt/L ระดับความสูงจากท่อให้อากาศ 5 นิ้วให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์น้อยที่สุด 1.29 และ 0.58 g dry wt/L ที่ระดับความสูง 1 3 5 นิ้วทั้งปริมาณเซลลูโลสและปริมาณ

เซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความสูง 3 นิ้วกับระดับกึ่งกลางน้ำหมักซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเนื่องจากใช้ความสูงในระดับที่ใกล้เคียงกัน

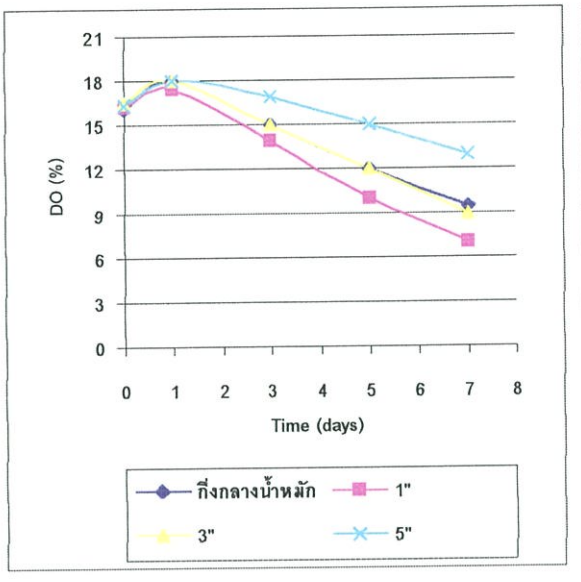
ที่ตำแหน่งของ SCMA matrix สูงจากท่อให้อากาศ 1 นิ้วให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์มากที่สุดทั้งนี้เนื่องมาจากอยู่ติดกับท่อให้อากาศซึ่งมีปริมาณออกซิเจนมากที่สุด (สมใจ ศิริโภค. 2537) ทำให้เชื้อเจริญได้อย่างรวดเร็วและสร้างเซลลูโลสได้ดี เลือกความสูงระดับนี้ใช้ในการศึกษาต่อไป ที่ตำแหน่งของ SCMA matrix สูงจากท่อให้อากาศ 5 นิ้วให้ปริมาณเซลลูโลสน้อยที่สุดเนื่องจากอยู่ห่างจากท่อให้อากาศทำให้ปริมาณออกซิเจนน้อยกว่าด้านล่างของถังหมัก การส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่ของเหลวในถังหมักจะเกิดขึ้นเนื่องจากแรงดันของของเหลวภายในถังหมักโดยจะเกิดมากที่สุดที่บริเวณฐานของถังหมักและน้อยลงตามลำดับความสูงที่เพิ่มขึ้น (สมใจ ศิริโภค. 2537)

ที่ตำแหน่งของ SCMA matrix สูงจากท่อให้อากาศ 5 นิ้วให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์น้อยที่สุดเนื่องจากอยู่ด้านบนของถังหมัก อากาศน้อยกว่าสภาวะอื่นทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ

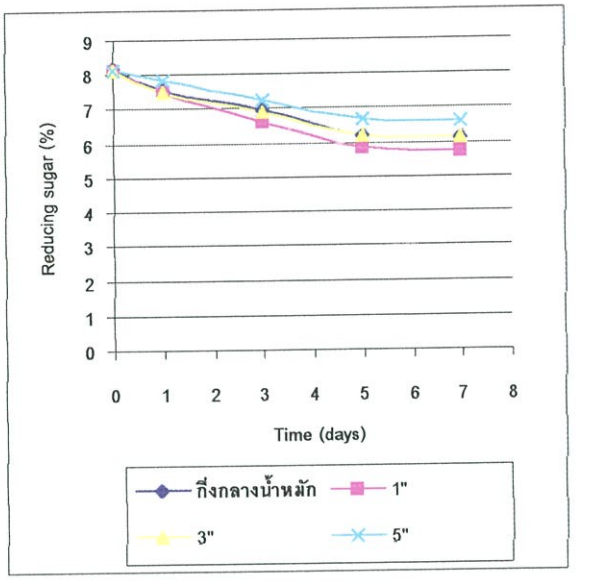
ตารางที่ 4.3 ผลของการวางตำแหน่งของ SCMA matrix ที่ระดับความสูงจากท่อให้อากาศต่างกัน ต่อปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

ตำแหน่งของ SCMA matrix ที่สูงจากระดับท่อให้อากาศ	ปริมาณเซลลูโลส (cellulose content, g dry wt/L)	ปริมาณเซลล์ (cell content, g dry wt/L)
ระดับกึ่งกลางน้ำหมัก	1.50 ± 0.07^{b}	0.75 ± 0.03^{b}
1 นิ้ว	1.62 ± 0.06^{a}	0.85 ± 0.02^{a}
3 นิ้ว	1.48 ± 0.06^{b}	0.78 ± 0.08^{b}
5 นิ้ว	1.29 ± 0.06^{c}	0.58 ± 0.08^{c}

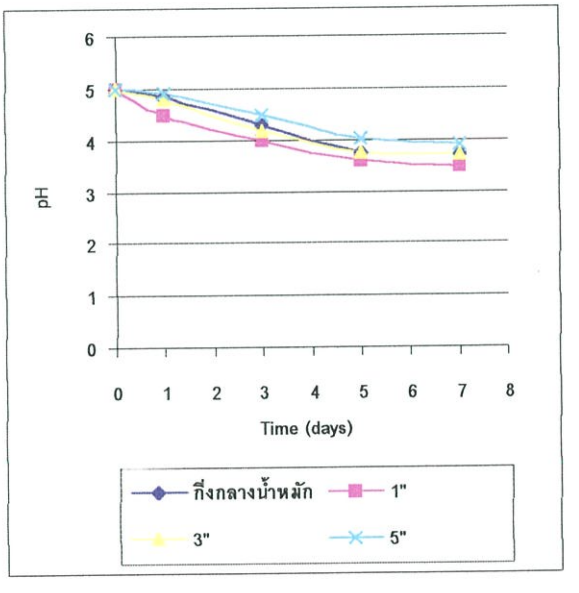
หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาตาม DMRT



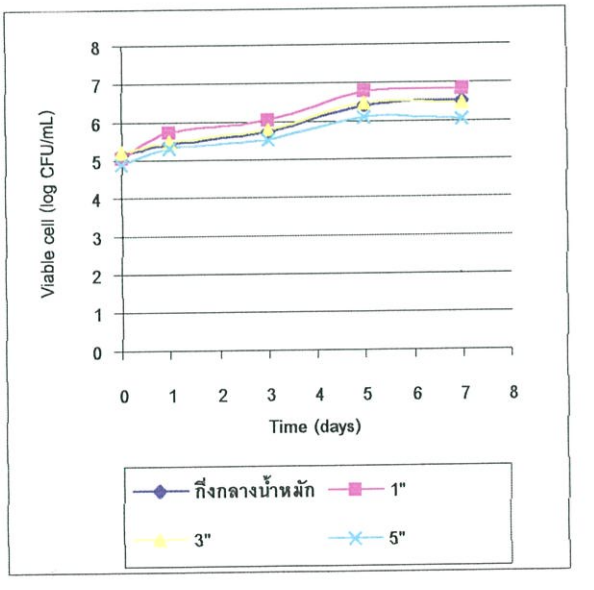
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4.3 ผลของระดับความสูงในการวางตำแหน่งของ SCMA matrix ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ต่อการเปลี่ยนแปลงของ :

(ก) ค่า DO

(ข) น้ำตาลรีดิวซ์

(ค) ค่า pH

(ง) จำนวนเซลล์ในน้ำหมัก

จากภาพที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ของการหมักเซลลูโลสที่ระยะเวลา 0 1 3 5 7 วัน เมื่อให้ SCMA Matrix สูงจากท่อให้อากาศ 1 นิ้ว 3 นิ้ว 5 นิ้ว ค่าของ pH จำนวนเซลล์ในน้ำหมัก น้ำตาลรีดิวซ์ DO เป็นค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ติดตามสภาวะของการหมักพบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ค่า pH DO น้ำตาลรีดิวซ์ลดลง จำนวนเซลล์ในน้ำหมัก ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น

4.3.2 ผลการศึกษาจำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้นของ SCMA matrix

ทำการหมักโดยใช้ผ้าฝ้าย เป็น SCMA matrix เพื่อหาจำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้น ที่สามารถตรึงเซลล์ได้ดีและให้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด ตัวควบคุมเป็น SCMA matrix ชั้นเดียวจากหัวข้อ 4.3.1 เพื่อเปรียบเทียบว่าจำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้นมีผลต่อการสร้างเซลลูโลสของเชื้อหรือไม่

ผลของปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์เมื่อจำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้นของ SCMA matrix ต่างกัน แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลของ จำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้นของ SCMA matrix ต่อปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

จำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้น	ปริมาณเซลลูโลส (cellulose content, g dry wt/L)	ปริมาณเซลล์ (cell content, g dry wt/L)
ชั้นเดียว	1.62 ± 0.03^{e}	0.75 ± 0.03^{e}
2 ชั้น 2 นิ้ว	1.94 ± 0.05^{c}	1.01 ± 0.08^{c}
2 ชั้น 3 นิ้ว	1.77 ± 0.03^{d}	0.89 ± 0.07^{d}
3 ชั้น 2 นิ้ว	2.27 ± 0.03^{a}	1.23 ± 0.09^{a}
3 ชั้น 3 นิ้ว	2.05 ± 0.07^{b}	1.11 ± 0.07^{b}

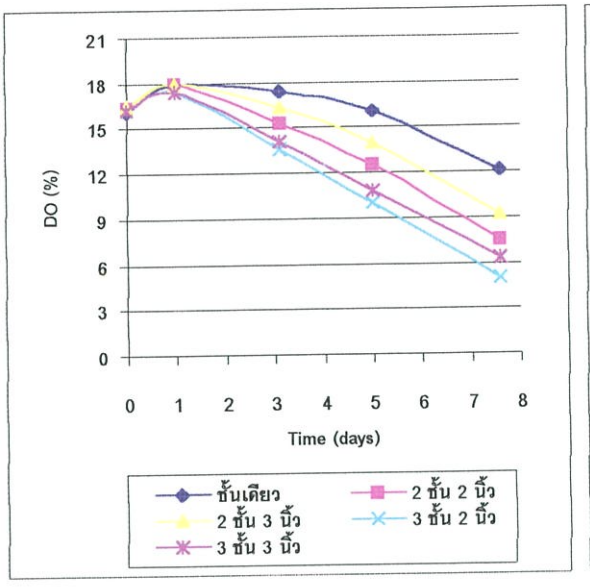
หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาตาม DMRT

จากตารางที่ 4.4 พบว่าจำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้นของ SCMA matrix มีผลต่อปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สภาวะของการหมักเซลลูโลสโดยใช้ SCMA matrix 1 ชั้นเป็นตัวควบคุมให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ 1.62 และ 0.75 g dry wt/L

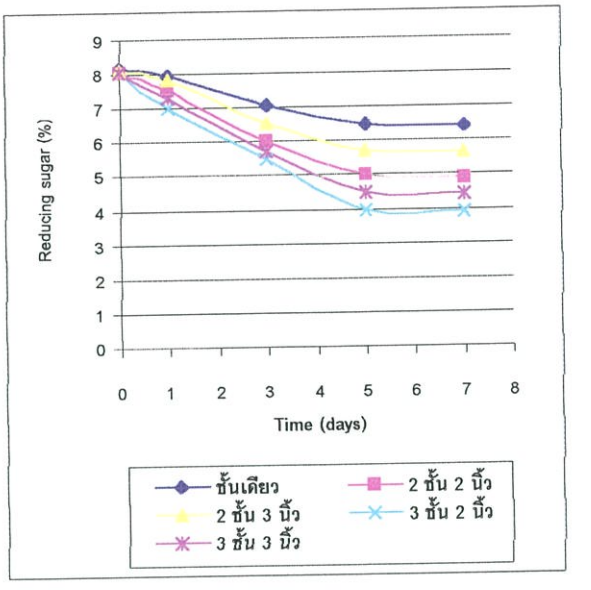
ตามลำดับ จำนวนชั้น 2 ชั้น ระยะห่างระหว่างชั้น 2 นิ้ว ให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์เป็น 1.94 และ 1.01 g dry wt/L จำนวนชั้น 2 ชั้น ระยะห่างระหว่างชั้น 3 นิ้ว ให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ 1.77 และ 0.89 g dry wt/L ตามลำดับ จำนวนชั้น 3 ชั้น ระยะห่างระหว่างชั้นเป็น 2 นิ้ว เป็นสภาวะที่ให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์มากที่สุด 2.27 และ 1.23 g dry wt/L ตามลำดับ จำนวนชั้น 3 ชั้น ระยะห่างระหว่างชั้น 3 นิ้ว ให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ 2.05 และ 1.11 g dry wt/L ตามลำดับ ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าจำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้นมีผลต่อการสร้างเซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum* DK

จากภาพที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ของการหมักเซลลูโลสที่ระยะเวลา 0 1 3 5 7 วัน เมื่อให้ SCMA matrix มี 5 ชนิดดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ค่า pH DO น้ำตาลรีดิวซ์ลดลง จำนวนเซลล์ในน้ำหมัก ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น เนื่องจากเชื้อใช้น้ำตาลและอากาศในการเจริญและมีการสร้างกรดเกิดขึ้น เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไปทำให้เชื้อมีการสร้างเซลล์มากขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ในน้ำหมักที่เพิ่มมากขึ้น

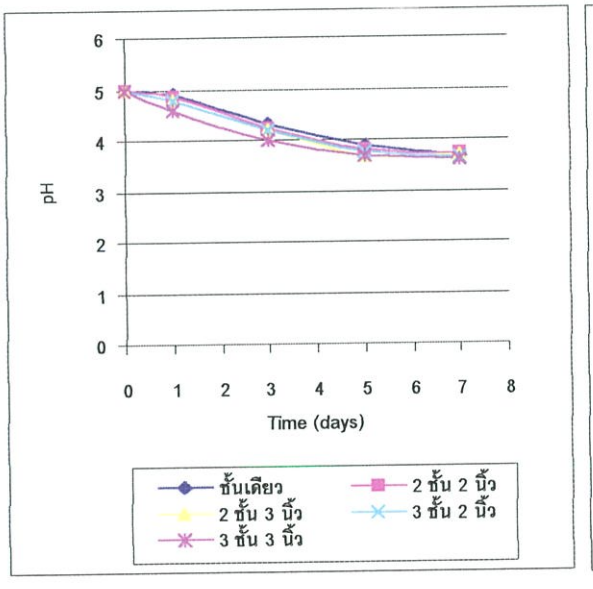
ลักษณะการเจริญของเชื้อจะเจริญห่อหุ้ม SCMA matrix ในที่นี้จากการทดลองพบว่ายิ่งมีจำนวนของ SCMA matrix มากเท่าใดเชื้อจะสร้างเซลลูโลสได้มากขึ้นเท่านั้น เมื่อใช้ SCMA matrix 3 ชั้นจะให้ปริมาณเซลลูโลสมากกว่า 2 ชั้น เนื่องจากจำนวนชั้นที่มากกว่ามีพื้นที่ที่เชื้อสามารถตรึงเซลล์ได้มากกว่าทำให้มีจำนวนเชื้อมากกว่า SCMA matrix 2 ชั้น ส่งผลให้เชื้อมีอัตราการเจริญเร็วกว่าและทำให้สร้างเซลลูโลสได้มากกว่าจำนวนชั้นที่น้อยกว่า ระยะห่างระหว่างชั้นทำให้การสร้างเซลลูโลสของเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งนี้พบว่าระยะห่างระหว่างชั้น 2 นิ้วให้ผลดีกว่า 3 นิ้ว เนื่องจากเมื่อเชื้อสร้างเซลลูโลสห่อหุ้ม SCMA matrix ในแต่ละชั้นที่ห่างกัน 2 นิ้วมีความเหมาะสมที่ทำให้เชื้อเกาะตัวและสานตัวกันได้หนาแน่นกว่าระยะห่าง 3 นิ้วและพบว่าที่ระยะห่างระหว่างชั้น 3 นิ้ว เชื้อเกาะตัวกันเบาบางกว่าและสานตัวกันได้หนาแน่นน้อยกว่าระยะห่างระหว่างชั้น 2 นิ้ว



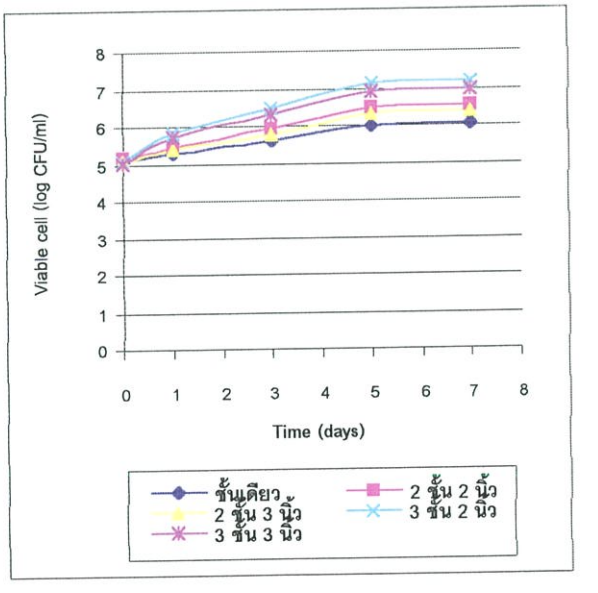
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4.4 ผลของจำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้นของ SCMA matrix ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ต่อการเปลี่ยนแปลงของ :

(ก) ค่า DO

(ข) น้ำตาลรีดิวซ์

(ค) ค่า pH

(ง) จำนวนเซลล์ในน้ำหมัก

4.4 ผลการใช้ SCMA matrix ในการตรึงเซลล์เพื่อเป็นหัวเชื้อในการหมักในลักษณะ Repeated Batch

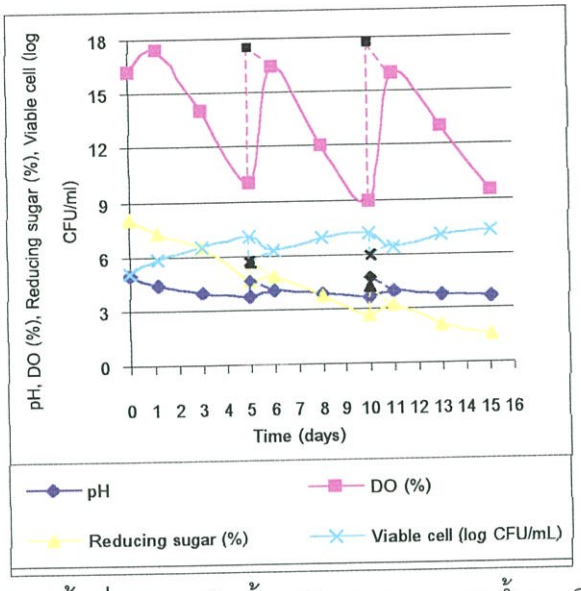
ทำการหมักโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการที่ศึกษาได้ โดยใช้อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm ใช้ SCMA matrix เป็นผ้าฝ้าย 3 ชั้น ระยะห่างระหว่างชั้น 2 นิ้ว ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน เก็บเกี่ยวเซลลูโลสแล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าไปใหม่ให้ได้ปริมาตร 1.5 ลิตรเท่าเดิม โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเข้าไปเป็นอาหารสูตรน้ำมะพร้าวเพื่อศึกษาว่าการใช้ SCMA matrix ตรึงเซลล์เพื่อเป็นหัวเชื้อสามารถหมักติดต่อกันได้กี่ครั้ง

สาเหตุที่ทำการหมักเพียง 5 วันแล้วจึงเก็บเกี่ยวเซลลูโลส เนื่องจากหลังจาก 5 วันเชื้อมีการเจริญและสร้างเซลลูโลสได้น้อย จากการศึกษาของลำพึง พุ่มจันทร์ (2545) พบว่าช่วงระยะเวลาวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 ของการหมัก เชื้อ *A. xylinum* DK มีการเจริญรวดเร็วและสามารถสร้างเซลลูโลสเป็นแผ่นวุ้นลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลวได้ปริมาณมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hestrin and Schramm (1954) และเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการที่จะนำไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อในการทดลอง ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 5 วันเพื่อผลิตเซลลูโลส และจากการหมักพบว่าในวันที่ห้าและวันที่เจ็ดปริมาณเซลลูโลสไม่แตกต่างกัน

ทำการหมักแบบ repeated batch โดยใช้ระยะเวลาการหมักรอบละ 5 วัน จำนวน 3 รอบเป็นเวลาทั้งหมด 15 วัน ทำการหมักโดยเมื่อระยะเวลาการหมัก 5 วัน เก็บเกี่ยวเซลลูโลสออกเป็นรอบแรกของการหมัก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 500 มิลลิลิตรหมักต่อไปอีก 5 วันเก็บเกี่ยวเซลลูโลส นับเป็นรอบที่สองเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 500 มิลลิลิตรแล้วหมักต่อไปอีก 5 วันเก็บเกี่ยวเซลลูโลสนับเป็นรอบที่สาม

จากการหมักรอบแรก ได้ปริมาณเซลลูโลส 2.25 g dry wt/L ปริมาณเซลล์ 1.26 g dry wt/L การหมักในรอบที่สอง ได้ปริมาณเซลลูโลส 2.22 g dry wt/L ปริมาณเซลล์ 1.24 g dry wt/Lการหมักใน batch ที่สาม ได้ปริมาณเซลลูโลส 2.21 g dry wt/L ปริมาณเซลล์ 1.18 g dry wt/L ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ทั้ง 3 รอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงผลในตารางที่ 4.5

เมื่อเทียบกับวิธีการหมักแบบ batch กับ repeated batch โดยใช้ SCMA matrix ในการตรึงเซลล์ ได้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างกัน โดยในการหมักแบบ batch ได้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ 2.27 และ 1.23 g dry wt/L ตามลำดับ การหมักแบบ repeated batch ทั้งสามรอบ ได้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์เฉลี่ย 2.23 และ 1.22 g dry wt/L ตามลำดับ ซึ่งปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์จากการหมักทั้ง 2 แบบไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการหมักแบบ repeated batch โดยใช้หัวเชื้อจากการตรึงเซลล์ด้วย SCMA matrix จากผ้าฝ้าย มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้หัวเชื้อจากการหมักโดยการเติมหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ของเชื้อที่เจริญอยู่ในน้ำหมัก (viable cell) น้ำตาลรีดิวซ์ ค่า DO และค่า pH ของการหมักแบบ Repeated batch โดยใช้เชื้อที่ถูกตรึงในการหมักรอบแรกเป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักรอบต่อไปของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร จำนวนทั้งหมด 3 รอบ รอบละ 5 วัน เป็นระยะเวลาทั้งหมด 15 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ : สัญลักษณ์สีดำเป็นวันที่เก็บเกี่ยวเซลลูโลสและเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองหมักได้เพียงสามรอบ เนื่องจากหลังจากรอบที่สามเกิดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น สังเกตได้จากน้ำหมักขุ่น มีฟอง เมื่อ spread plate ได้โคโลนีของเชื้ออื่น เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนในระหว่างการหมัก ลักษณะวุ้นเซลลูโลสในถังหมัก มีเมือก ลื่น เป็นฝ้าขาว จากการปนเปื้อนของเชื้ออื่นพบว่าเกิดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นแบ่งเป็น 2 กรณี คือ กรณีแรกน้ำหมักเริ่มขุ่น เมื่อหมักต่อไปน้ำหมักขุ่นมีฟอง และวุ้นเซลลูโลสที่เชื้อสร้างจะเละ ไม่เกาะตัวกันเป็นก้อน และเชื้อไม่ยึดเกาะที่ SCMA matrix กรณีที่สองน้ำหมักใส วุ้นเซลลูโลสมีลักษณะปนเปื้อนกับเชื้อราสีดำที่เกิดที่ข้างถังหมัก ลักษณะของวุ้นเซลลูโลสที่เก็บเกี่ยวได้เป็นเส้นใยของเชื้อรา เนื้อวุ้นเซลลูโลสไม่เหนียว และเชื้อราเจริญไปทั่วทั้งถังหมัก ไม่เกาะที่ SCMA matrix ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ สุเนตร มนต์วิเศษ และคณะ (2543) ที่ศึกษาถึงจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในกระบวนการหมักวุ้นน้ำมะพร้าวและผลของกรดอะซิติก แอลกอฮอล์ และโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ต่อการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อน จากการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อที่ปนเปื้อนในวุ้นน้ำมะพร้าวในเขตจังหวัดสมุทรสงคราม และที่สถาบันค้นคว้า

และพัฒนาผลิตภัณฑ์ อาหาร พบว่าเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ เช่น เชื้อยีสต์และแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้วุ้นเละ ไม่เกิดแผ่น เนื้อวุ้นเป็นรู น้ำขุ่น วุ้นเน่า วุ้นหนาและมีเมือก วุ้นเกิดแผ่นแก๊สดันจนแผ่นวุ้นโค้ง ไม่เรียบ เกิดจุดสีขาวบนเนื้อวุ้น และวุ้นเป็นฝ้าเป็นต้น ยีสต์และแบคทีเรียปนเปื้อนสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้แบ่งเป็นเชื้อยีสต์ 16 สายพันธุ์ ยีสต์ปนเปื้อนนี้สามารถที่จะสันนิษฐานเชื้อได้บางกลุ่มโดยดูจากลักษณะของสปอร์ รูปร่างของเซลล์ ปฏิกิริยาการหมักและการเกิดแก๊ส กลุ่มยีสต์ปนเปื้อนที่พบมากที่สุดเป็นสายพันธุ์ของ *Candida* spp. *Saccharomyces* spp. และ *Klockera* spp. ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ปนเปื้อนมีสองลักษณะคือ รูปไข่ และรูปกลม จุลินทรีย์ปนเปื้อนที่พบในวุ้นน้ำมะพร้าวนอกเหนือจากยีสต์แล้ว ที่พบรองลงมาคือกลุ่มของแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ เมื่อย้อมสีเซลล์ด้วยการย้อมสีแบบแกรม (Gram' staining) พบว่ามีเซลล์สองลักษณะ คือ รูปกลมแกรมบวก และรูปแท่งแกรมลบ จากลักษณะทางสันฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียปนเปื้อนที่แยกได้จัดแบคทีเรียเป็นสองสายพันธุ์คือ Micrococcaceae และ Enterobacteriaceae

4.5 ผลการศึกษาการขยายขนาดการหมักเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในลักษณะ Repeated Batch

ทำการหมักเหมือนหัวข้อที่ 4.4 โดยใช้ SCMA matrix จากผ้าฝ้าย จำนวนชั้น 4 ชั้น ระยะห่างระหว่างชั้น 2 นิ้ว หมักในถังหมักขนาด 7 ลิตร ปริมาตรการทำงานเป็น 5 ลิตร

การหมักโดยใช้ SCMA matrix 4 ชั้น โดยสามารถเพิ่มจำนวนชั้นของ SCMA matrix ได้โดยเพิ่มขึ้นตามระดับความสูงของน้ำหมัก และขนาดของโครงลวดแสตนเลสสามารถเพิ่มหรือลดขนาดลงได้ตามขนาดของถังหมัก แต่ระยะห่างระหว่างชั้นต้องไม่เปลี่ยนแปลง คือ ห่างกัน 2 นิ้ว โดยเส้นผ่าศูนย์กลางของโครงลวดแสตนเลสชั้นบนสุดไม่ควรใหญ่เกินไป เพราะจะทำให้อากาศในถังไม่หมุนเวียนได้ไม่ดีและไม่สะดวกในการเก็บเกี่ยวเซลลูโลส ชั้นล่างต้องไม่เล็กเกินไป เพราะจะทำให้มีพื้นที่ให้เชื้อยึดเกาะได้น้อย ไม่ก่อให้เกิดประโยชน์ในการใช้เป็น SCMA matrix ตรึงเซลล์

เมื่อทำการหมักครบ 5 วันเก็บเกี่ยวเซลลูโลสเป็นรอบแรก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาตรเท่ากับ 1.5 ลิตรหมักต่อไปอีก 5 วันเก็บเกี่ยวเซลลูโลสเป็นรอบที่สอง เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 ลิตรแล้วหมักต่อไปอีก 5 วันเก็บเกี่ยวเซลลูโลสนับเป็นรอบที่สาม

จากการหมักรอบแรกได้ปริมาณเซลลูโลส 2.12 g dry wt/L ปริมาณเซลล์ 1.2 g dry wt/L การหมักในรอบที่สอง ได้ปริมาณเซลลูโลส 2.17 g dry wt/L ปริมาณเซลล์ 1.25 g dry wt/Lการหมักในรอบที่สามได้ปริมาณเซลลูโลส 2.14 g dry wt/L ปริมาณเซลล์ 1.21 g dry wt/L ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ทั้ง 3 รอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงผลในตารางที่ 4.6

เมื่อคำนวณ productivity ในแต่ครั้งของการหมัก (หมักครั้งละ 3 รอบ) ได้ปริมาณเซลลูโลส 32.15 g dry wt/น้ำหมัก 8 Lหรือเท่ากับ 4 g dry wt/L ต่อระยะเวลาการหมัก 15 วัน ซึ่งได้ผลผลิตในปริมาณที่สูงและใกล้เคียงกับการหมักปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร และใช้ระยะเวลาการหมักลดลง 6 วัน เมื่อเทียบกับการหมักแบบ batch ที่ได้ปริมาณเซลลูโลส 2.27 g dry wt/L โดยการหมัก 3 ครั้งต้องใช้เวลาทั้งหมด 21 วัน

ตารางที่ 4.6 ผลการหมักแบบ Repeated batch โดยใช้เชื้อที่ถูกตรึงในการหมักรอบแรกเป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักรอบต่อไป ต่อปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร จำนวนทั้งหมด 3 รอบ รอบละ 5 วัน เป็นระยะเวลาทั้งหมด 15 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

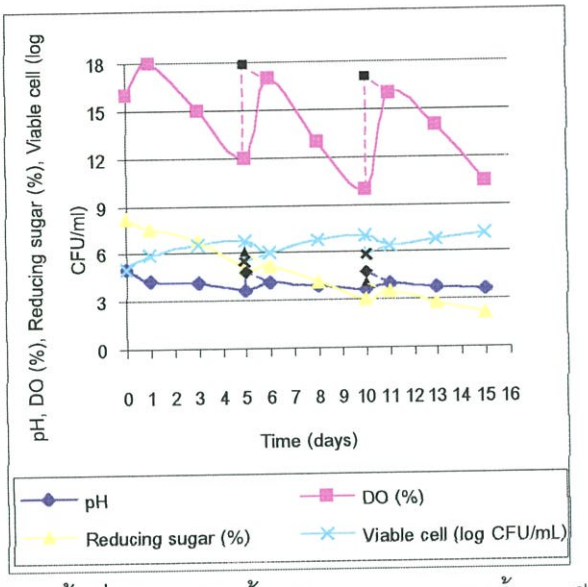
การหมักในรอบที่	ปริมาณเซลลูโลส (cellulose content, g dry wt/L)	ปริมาณเซลล์ (cell content, g dry wt/L)
1	2.12^{ns}	1.2^{ns}
2	2.17^{ns}	1.25^{ns}
3	2.14^{ns}	1.21^{ns}

หมายเหตุ : ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ติดตามผลการทดลองด้วยการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ น้ำตาลรีดิวซ์ ค่า DO ค่า pH พบว่าผลที่วิเคราะห์ได้มีทิศทางเดียวกับการหมักในถังหมักขนาดเล็ก ดังแสดงในภาพที่ 4.6

ผลการขยายขนาดการหมักดังที่กล่าวมาแล้วพบว่าปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ที่ได้แตกต่างกัน โดยน้อยกว่าปริมาณเซลลูโลสจากการหมักในถังหมักปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตรเพียงเล็กน้อย แสดงว่าการขยายขนาดการหมักโดยใช้การตรึงเซลล์มีความเป็นไปได้สูง

เมื่อเก็บเกี่ยวในครั้งที่สาม แล้ว spread plate พบว่าเกิดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นเหมือนกับการหมักในถังหมัก ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร คือ น้ำหมักเริ่มขุ่น เมื่อหมักต่อไป น้ำหมักขุ่นมีฟองและวุ้นเซลลูโลสที่เชื้อสร้างจะเละ ไม่เกาะตัวกันเป็นก้อน และเชื้อไม่ยึดเกาะที่ SCMA matrix หรือน้ำหมักใส วุ้นเซลลูโลสปนเปื้อนจากเชื้อรา ลักษณะของวุ้นเซลลูโลสที่เก็บเกี่ยวได้เป็นเส้นใยของเชื้อรา เนื้อวุ้นเซลลูโลสไม่เหนียว และเจริญไปทั่วถังหมัก ไม่เกาะที่ SCMA matrix ทำให้ต้อง stop activity และสิ้นสุดการหมัก



ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ของเชื้อที่เจริญอยู่ในน้ำหมัก (viable cell) น้ำตาลรีดิวซ์ ค่า DO และค่า pH ของการหมักแบบ Repeated batch โดยใช้เชื้อที่ถูกตรึงในการหมักรอบแรกเป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักรอบต่อไปของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร จำนวนทั้งหมด 3 รอบ รอบละ 5 วัน เป็นระยะเวลาทั้งหมด 15 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ : สัญลักษณ์สีดำเป็นวันที่เก็บเกี่ยวเซลลูโลสและเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการหมักเซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum* DK ในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร ในกระบวนการการหมักแบบ SCMA matrix process เป็นการตรึงเซลล์โดยใช้ SCMA matrix เป็นวัสดุให้เชื้อยึดเกาะ ทำการหมักโดยใช้อาหารสูตรน้ำมะพร้าว (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ. 2535) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักโดยใช้ SCMA matrix สรุปได้ดังนี้

1. ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm เชื้อสามารถเจริญและสร้างปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ได้ดีเป็น 1.22 และ 0.59 g dry wt/L ตามลำดับ

2. ผ้าฝ้าย (cotton) เป็น SCMA matrix เหมาะสมต่อการหมัก โดยให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์มากที่สุดเป็น 1.50 และ 0.75 g dry wt/L ตามลำดับ

3. ระดับความสูงของตำแหน่ง SCMA matrix สูงจากท่อให้อากาศ 1 นิ้ว และจำนวนชั้นและระยะห่างระหว่างชั้นเป็น 3 ชั้นแต่ละชั้นห่างกัน 2 นิ้ว เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ที่เชื้อสามารถเจริญได้ดีโดยได้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ 2.27 และ 1.23 g dry wt/L ตามลำดับ

4. การใช้ SCMA matrix ในการตรึงเซลล์เพื่อเป็นหัวเชื้อในการหมักในลักษณะ Repeated Batch ทำการหมักจำนวนทั้งหมด 3 รอบ รอบละ 5 วัน เป็นระยะเวลาทั้งหมด 15 วัน ให้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์เฉลี่ยทั้ง 3 รอบ 2.22 และ 1.22 g dry wt/L ตามลำดับ มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการหมักโดยการใช้หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยได้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ 2.27 และ 1.23 g dry wt/L ตามลำดับ

5. การขยายขนาดการหมักเซลลูโลสโดยใช้การตรึงเซลล์ในถังหมักปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร ได้ปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกับถังหมักปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร แสดงว่าการขยายขนาดการหมักมีผลต่อสภาวะการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* DK น้อย

ข้อเสนอแนะ

1. ควรปรับปรุงวิธีการเก็บเกี่ยวให้มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นน้อยที่สุด เพื่อจะได้เพิ่มรอบของการหมักมากขึ้นและจะทำให้มี productivity มากขึ้นด้วย
2. ถ้า maintain pH ของการหมักให้เท่ากับ 5.0 ตลอดระยะเวลาการหมักทำให้เพิ่ม productivity มากขึ้น
3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเข้าไปใหม่ทุกรอบควรมีความเข้มข้นของน้ำตาลมากกว่าเริ่มต้น และเติมฮอร์โมนหรือวิตามินเพื่อให้เชื้อเจริญได้ดี
4. เปลี่ยนถังหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่โดยใช้ SCMA matrix ที่มีเชื้อที่ถูกตรึงอยู่เป็นหัวเชื้อ ทำให้ไม่ต้องเตรียมหัวเชื้อใหม่

บรรณานุกรม

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2527. ฝ้าย. เอกสารวิชาการเล่มที่ 9. กรุงเทพฯ : ประดิษฐ์การพิมพ์.

โครงการเผยแพร่ความรู้และผลงานทางวิชาการผ่านสื่อหนังสือพิมพ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2544, 25 กันยายน. "วุ้นน้ำมะพร้าว กับคุณสมบัติของการเป็นอาหารเส้นใย." **เดลินิวส์**. หน้า 8.

จารุวรรณ์ ศิริพรรณพร ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ สิริพร สธนเสาวภาคย์ สร้อยทอง สายหยุดทอง กาญจนิจ วาจนะวินิจ ศรีเมือง มาลีหวล และสมคิด ธรรมรัตน์. 2544. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำกะทิ. **อาหาร**. 31(3) : 166-173.

เชิดชัย ตั้งอมรสุขสันต์ และวราวุฒิ ครูส่ง. 2536. ผลิตภัณฑ์วุ้นสวรรค์ผสมน้ำลิ้นจี่. **อาหาร**. 23(2) : 107-114.

ณัฐพล ฟ้าภิญโญ. 2542. ผลของออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธรณิศวร์ พิรุณละออง. 2545. ทรัพย์ชุมชน : แปรใยบวบสู่สายใยชุมชน. [Internet, C]. Available : http://www.bangkokbiznews.com/2002/03/12/jud/index.php?news=jud3.html.

นวลแข ปาลิวนิช. 2534. ความรู้เรื่องผ้าสำหรับวัยรุ่น. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการ กระทรวงศึกษาธิการ.

บรรเลง ศรนิล. 2525. เทคโนโลยีพลาสติก. กรุงเทพฯ : ห้างหุ้นส่วนจำกัดการพิมพ์.

บวบ : สมุนไพรแบบเบ็ดเสร็จ. มปป. บวบ : สมุนไพรแบบเบ็ดเสร็จ. [Internet, D]. Available : http://www.khonnaruk.com/html/verandah/herb/h_242.html.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2540. **จุลชีววิทยาการหมัก : วิตามินและสารสี**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลลิดา บุญโฉม และวราภรณ์ พุทธัสสะ. 2542. การผลิตวัสดุจากพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิโอลิฟินส์และสาหร่ายสีแดง (Gracilaria). โครงงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต. ภาควิชาเคมี. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

ลำพึง พุ่มจันทร์. 2545. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter* sp. จากตัวอย่างผลไม้ในเขตร้อนและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เลิศฤทธิ์ เลิศวัฒนวัลลี. 2543. จลนศาสตร์การเจริญเติบโตและการขยายขนาดการผลิตเชื้อ *Acetobacter xylinum* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพระบบกะ. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วราวุฒิ ครูส่ง นฤมล ชูวัฒนะเดช เชิดชัย ตั้งอมรสุขสันต์ และอินทิรา ปรุงเลิศบัวทอง. 2535. การผลิตวุ้นสวรรค์ในน้ำมะพร้าว. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า**. 10(4) : 46-59.

วราวุฒิ ครูส่ง กรวิกา สุขศรีวงษ์ และปนัดดา พวงเกษม. 2536. การผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* ในน้ำหางนม. **วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง**.1(1) : 47-54.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2539ก. วุ้นมะพร้าว : การผลิตและการใช้ประโยชน์. ในเอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง "คาร์โบไฮเดรต : ปัจจุบันและอนาคต" หน้า 32-38. 8-10 พฤษภาคม 2539 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

วราวุฒิ ครูส่ง และกรวิกา สุขศรีวงษ์. 2539ข. **เทคโนโลยีชีวภาพ**(ฉบับปรับปรุงใหม่). กรุงเทพฯ : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.กรุงเทพฯ.

ศิริพงษ์ เปรมจิต. 2542. การผลิตเซลลูโลสจากกากน้ำตาลโดย *Acetobacter xylinum* ATCC 10254. **วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร**. 7(2) : 18-32.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2539. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2538/2539. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เอกสารสถิติการเกษตรเลขที่ 28/2539.

สุเนตร มนต์วิเศษ ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ จารุวรรณ์ ศิริพรรณพร และศิริพร เอื้ออังกูร. 2543. จุลินทรีย์ปนเปื้อนในกระบวนการหมักวุ้นน้ำมะพร้าวและผลของกรดอะซิติก แอลกอฮอล์และโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ต่อการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อน. **อาหาร**. 30(3) : 197-208.

สุเมธ ตันตระเธียร. 2537. วุ้นสวรรค์. เอกสารประกอบการอบรมและสัมมนาเรื่องการผลิตวุ้นสวรรค์. 4 เมษายน 2537. สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี(ไทย-ญี่ปุ่น). กรุงเทพฯ. 1-7.

สมใจ ศิริโภค. 2537. **เทคโนโลยีการหมัก**. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ.

อัจฉรา มีวาสนา. 2510. การแสดงส่วนประกอบอาหารพื้นเมืองของประเทศ. **วารสารวิทยาศาสตร์การแพทย์**. 9(1-4) : 1-29.

Alaban, C.A. 1962. Studies on the Optimum Conditions for Nata de coco Bacterium of Nata Formation in Coconut water. Phil. Jour. Agric. 45(9) : 490-516.

AOAC. Official method of analysis. 1995. 16th ed. Association of Analysis Chemists. Virginia, 1995.

Bardi, E., Koutinas, A. A. and Kanellaki, M. 1997. Room and Temperature Brewing with Yeast Immobilized on Gluten Pellets. Process Biochem. 32(8) : 691-696.

Bungay, I. Henry, R. and Gonzalo, C. **Production of Microbial Cellulose Using a Rotating Disk Film Bioreactor.** U.S patent no. 5955326, September 1999.

Chao, Y., Sugano, Y., Yoshinga, F. and Shoda, M. 1997. Production of Bacterial Cellulose by *Acetobacter xylinum* with an Airlift Reactor. 11(11) : 829-832.

Chao, Y., Ishida,T, Sugano, Y. and Shoda, M. 1999. Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L Internal-Loop Airlift Reactor. **Biotech Bioeng**. 68(3) : 345-352.

Chao, Y., Sugano, Y. and Shoda M. 2000. Bacterial Cellulose Production under Oxygen Enriched Air at Different Fructose Concentrations in a 50-liter,Internal-loop Airlift Reactor. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 55 : 673-679.

Cheng H-P., Wang P-M., Chen, J-W. and Wu, W-T. 2002. Cultivation of *Acetobacter xylinum* for Bacterial Cellulose Production in a Modified Airlift Reactor. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 35 : 125-132.

Chibata, I. 1978. Immobilized Enzymes. Research and Development. , John Wiley & Sons. n.p.

Hestrin, S. and M. Schramm. 1954. Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of Freeze-dried Cell Capable of Polymerizing Glucose to Cellulose. **Biochem. J.** 58 : 345

Hwang, J. W., Yang, Y. K., Hwang, J. K., Pyun, Y. R. and Kim, Y. S. 1999. Effect of pH and Dissolved Oxygen on Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in Agitated Culture. **J of Bioscience and Bioengeineering.** 88(2) : 183-188.

Ishikawa, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T. and Yoshinaga, F. 1995. Increase in Cellulose Production by Sulfaguanidine-resistant Mutants Derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *Sucrofermentans*. **Biosci. Biotech. Biochem.** 59 : 2259-2262.

Joris, K., Billet, F., Drieghs, S. and Vandamme, E. 1993. Enhanced Bacterial Cellulose Yield in Aerated *Acetobacter xylinum* Culture by Adding Micro-particles. In Cellulosics : Materials for Selective Separations and Other Technologies. Eliss Horwood. Great Britian. Pp. 239-244.

Kojima, Y., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., and Yamada, Y. 1998. The Characterization of Acetic Acid Bacteria Efficiently Producing Bacterial Cellulose from Sucrose : The Proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *Nonacetoxidans* subsp. *nov.* **Biosci. Biotech. Biochem.** 62 (1) : 185-187.

Kouda, T. Naritomi,T., Yano, H. and Yoshinaga, F. 1997. Effect of Oxygen and Carbon Dioxide Pressures on Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter* in Aerated and Agitated Culture. 84(2) : 124-127.

Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H. and Yoshinaga, F. 1998. Inhibitory of Carbon Dioxide on Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter* in Agitated Culture. 85(3) : 318-321.

Krusong, W., Takagi, M. and Yoshida, T. 1995. "Cellulose Porous Beads as Microparticle Carrier for Enhancing Cellulose Production in Agitated Culture of *Acetobacter xylinum*." Ann. Rep. ICBitech.

Krusong, W., Phapinyo, N. and Yoshida, T. 1998a. "Counteraction of Negative Effect on Cellulose Production in Agitated Submerged Culture of *Acetobacter xylinum*." Asian Network on Microbial Researches GadjahMada University, Yogyakarta, Indonesia. 521-527.

Krusong, W., Phapinyo, N., Takagi, M., Nakajima, M. and Yoshida, T. 1998b. Process Improvement for Cellulose Gel Formation in Continuous Stirred Tank Reactor. Annual Reports of ICBiotech. Volume 21 : 868-879.

Krusong, W., Jindaprasert, A. and Yoshida, T. 2001a. *Acetobacter xylinum* DK : A Cellulose Gel Production Strain with Two Distinctive Types of Colony for Agitated Cultivation. **King Mongkut Inst. Tech. Ladkrabang J.** 62(9) : 25-28.

Krusong, W., Vongchareonsathit, A., Nakajima, M. and Yoshida, T. 2001b. Enhancement of Bacterial Cellulose Gel Accumulation of *Acetobacter xylinum* DK by using Static Cellulose Microfibril Attachment Matrix in Agitated Cultivation. Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics. 15 : (424-431) JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC Joint Seminar November 7-9, 2001 Bangkok, Thailand.

New Cellulose-Producing Bacterium. n. d. [Internet]. Available : http://res2.agr.ca/parc-crapac/english/3electronic_publications/growidea/giv6a/t

Production of biocellulose (bacterial cellulose). n.d. [Internet, A]. Available : http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/english/cellulose/

Research Field : Development of Functional Polysaccharides. n. d. [Internet, B]. Available : http://brc.yonsei.ac.kr/act-eng.htm

Scott, W, and Cannon, R. E. 1989. Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum*. **Applied and Environmental Microbiology**. 55(10) : 2448-2452.

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

Toyosaki, H. Toda, K. and Oikawa, T. 1995. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. **Biosci. Biotech. Biochem.** 59 : 1498-1502.

Verschuren, P. G., Cardona, T. D., Robert Nout, 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. **Biosci Bioeng.** 89(5) : 414-419.

Verderbelt, J.M. 1954. Nutritive value of coconut. **Nature.** 156 : 174-175.

Watanabe, K. and Yamanaka, S. 1995. Effect of Oxygen Tension in the Gaseous Phase on Production and Physical Properties of Bacterial Cellulose Formed under Static Culture Conditions. **Biosci.Biotech.Biochem.** 59(1) : 65-68.

Willaert, R. G., G. V. Baron and L.D. Backer. 1996. Immobilized Living Cells : Systems, Modelling, and Experimental Methods. John and Sons. n.p.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **อาหารสูตรน้ำมะพร้าว** (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ. 2539)

$NH_4(SO_4)_2$	ร้อยละ 0.9
ซูโครส	ร้อยละ 6

น้ำมะพร้าวแก่

ปรับ pH 5 ด้วย acetic acid

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเวลา 15 นาที

2. **อาหารแข็งสูตรน้ำมะพร้าว** (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ. 2539)

$NH_4(SO_4)_2$	ร้อยละ 0.9
ซูโครส	ร้อยละ 6
วุ้น	ร้อยละ 1.5

น้ำมะพร้าวแก่

ปรับ pH 5 ด้วย acetic acid

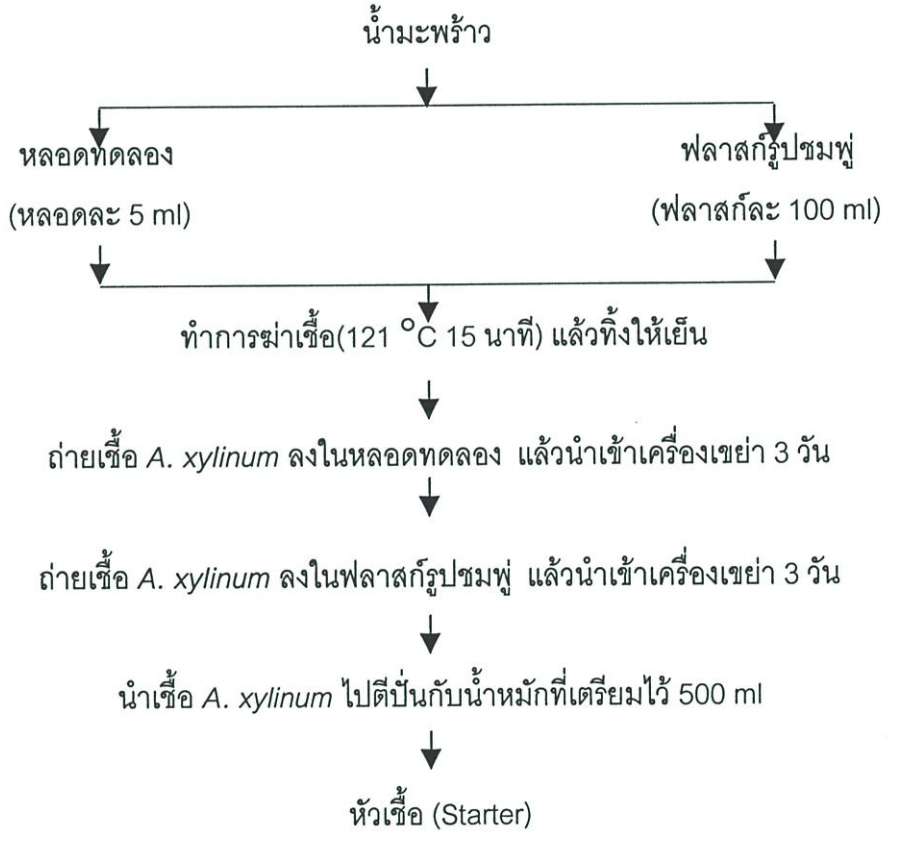
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมหัวเชื้อและเก็บเกี่ยวเซลลูโลส

1. การเตรียมหัวเชื้อ *A. xylinum* (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ. 2535)

เตรียมน้ำหมักใช้อาหารสูตรน้ำมะพร้าว ปริมาตร 100 ml ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเวลา 15 นาที ถ่ายเชื้อ *A. xylinum* จากหลอดทดลองลงในน้ำหมักที่เตรียมไว้ทำการหมักเป็นเวลา 3วันบน Rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 100 rpm นำน้ำหมักที่ได้มาตีปั่นผสมกับน้ำหมักปริมาตร 500 ml ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที



ภาพที่ ข1 การเตรียมหัวเชื้อ *A. xylinum*

ที่มา : วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ (2535)

2. ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเซลลูโลส

2.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส (Krusong *et al.* 1995)

นำน้ำหมักมากรองแยกเอาเซลลูโลสออกจากน้ำหมักแล้วหาปริมาณเซลลูโลส (cellulose content) โดยนำเซลลูโลสที่ได้จากการกรองไปแช่น้ำกลั่นทิ้งไว้ โดยเปลี่ยนน้ำบ่อยๆ จนน้ำกลั่นที่แช่ใสกรองแยกเซลลูโลสออก นำไปกำจัดตัวเซลล์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยนำเซลลูโลสแช่จนท่วม นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วแช่น้ำกลั่น โดยเปลี่ยนน้ำบ่อย ๆ นำไปชั่งก่อนอบ แล้วอบที่อุณหภูมิ 63°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนักหลังอบ

นำเซลลูโลสที่ได้แช่น้ำทิ้งไว้ โดยเปลี่ยนน้ำบ่อย ๆ

↓

กำจัดสิ่งเจือปน(เซลล์)โดยแช่ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2

↓

นำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C 30 นาทีทิ้งไว้ให้เย็น

↓

แช่น้ำกลั่น โดยเปลี่ยนน้ำบ่อย ๆ

↓

นำไปอบที่อุณหภูมิ 63 °C 24 ชั่วโมง

↓

ชั่งน้ำหนักหลังอบของเซลลูโลส

ภาพที่ ข2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Krusong *et al.* (1995)

หมายเหตุ : น้ำหนักแห้งที่ได้คิดเป็นปริมาณเซลลูโลสในหน่วยกรัมต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2 **วิธีวิเคราะห์ปริมาณเซลล์** (Krusong *et al.* 1995)

นำน้ำหมักมากรองแยกเอาเซลลูโลสออกจากน้ำหมักแล้วหาปริมาณเซลล์ โดยนำเซลลูโลสที่ได้จากการกรองไปแช่น้ำกลั่นทิ้งไว้ โดยเปลี่ยนน้ำบ่อยๆจนน้ำกลั่นที่แช่ใส กรองแยกเซลลูโลสออก โดยนำเซลลูโลสแช่ในน้ำกลั่นจนท่วมนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วแช่น้ำกลั่น โดยเปลี่ยนน้ำบ่อย ๆ แล้วอบที่อุณหภูมิ 63°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนักหลังอบ

นำเซลลูโลสที่ได้แช่น้ำทิ้งไว้ โดยเปลี่ยนน้ำบ่อย ๆ

↓

โดยแช่ในน้ำกลั่น

↓

นำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C 30 นาทีทิ้งไว้ให้เย็น

↓

ชั่งน้ำหนักเซลลูโลสก่อนอบ

↓

นำไปอบที่อุณหภูมิ 63 °C 24 ชั่วโมง

↓

ชั่งน้ำหนักหลังอบของเซลลูโลส

ภาพที่ ข3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณเซลล์

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Krusong *et al.* (1995)

หมายเหตุ : นำน้ำหนักแห้งที่ได้ลบด้วยปริมาณเซลลูโลส ค่าที่ได้เป็นปริมาณเซลล์

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธี Shaffer-Somogyi Micro Method (AOAC.1995)

1.1 การเตรียมสารเคมี

1.1.1 Shaffer-Somogyi carbonate 50 reagent

ละลาย anhydrous Na_2CO_3 25 กรัม และ Potassium sodium tartrate.$4H_2O$ หรือ Rochelle salt 25 กรัม ในน้ำกลั่น 500 กรัม เติมสารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ ที่มีความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 75 มิลลิลิตร โดยให้ปลายกรวยจุ่มอยู่ในสารละลาย พร้อมกับคนอยู่ตลอดเวลา เติม $NaHCO_3$ 20 กรัม คนให้ละลายแล้วเติม KI 5 กรัม

ถ่ายสารละลายทั้งหมดลงในขวดตวงปริมาตร ขนาด 1 ลิตร แล้วเติม 0.001N KIO_3 (เตรียม 0.001 โดยละลาย 3.567 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ค้างคืนเพื่อให้คงตัวก่อนใช้

1.1.2 สารละลาย Iodine-oxalate

ละลาย KI 25 กรัม และ $K_2C_2O_4$ 2.5 กรัม ในน้ำกลั่นในบีกเกอร์แล้วถ่ายใส่ขวดตวงปริมาตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ให้เตรียมน้ำยานี้ใหม่ทุกสัปดาห์

1.1.3 สารละลายมาตรฐาน 0.1 N Sodium thiosulfate standard stock solution

ละลาย $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดเบา ๆ นาน 5 นาที แล้วถ่ายใส่ขวดสีชาในขณะร้อน นำไปเก็บในที่มืดและเย็น

การคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอน (standardization) โดยชั่ง $K_2Cr_2O_7$ ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 0.2-0.23 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากคลอรีนที่มี KI 2 กรัม เติม 1 N HCl 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บในที่มืดทันทีหรือห่อหุ้มด้วยอะลูมิเนียม ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำมาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ข้างต้น ให้เติม starch indicator เมื่อสีของไอโอดีนจางลงหลังจากไตเตรทไประยะหนึ่ง

คำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานจากสูตร

$$\text{Normality ของสารละลาย } Na_2S_2O_3.5H_2O = \frac{(\text{กรัมของ } K_2Cr_2O_7)\ (1000)}{(\text{มิลลิลิตรของ } Na_2S_2O_3.5H_2O)(49.032)}$$

1.1.4 สารละลายมาตรฐาน 0.005 Sodium thiosulfate standard stock solution

เจือจาง 50 มิลลิลิตร 0.1 N Sodium thiosulfate standard stock solution ด้วยน้ำกลั่นในขวดตวงปริมาตรขนาด 1 ลิตร ให้เตรียมน้ำยานี้ใหม่ทุกวัน

1.1.5 สารละลาย starch indicator

ผสม soluble starch 2.5 กรัม กับ HgI_2 10 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วละลายในน้ำเดือดให้มีปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.1.6 สารละลาย 2 N H_2SO_4

เจือจาง conc. H_2SO_4 56 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร

1.2 วิธีวิเคราะห์

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณกลูโคสอยู่ในช่วง 0.5-2.5 มิลลิกรัม (มีปริมาณกลูโคส 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ในหลอดทดสอบขนาด 25 x 200 มิลลิลิตร เตียม blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างควบคุมโดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคส 0.1 –0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำยา Shaffer Somogyi carbonate 50 reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการแกว่งเบา ๆ

ปิดหลอดด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 15 นาที

ทำให้เย็นในอ่างน้ำไหล 4 นาที

ระวังอย่าให้หลอดทดสอบกระเทือนในระหว่างการต้มและทำให้เย็น

เติมสารละลาย Iodine-oxalate 2 มิลลิลิตร โดยค่อย ๆ ไหลลงไปตามข้างหลอด

เติม 2N H_2SO_4 3 มิลลิลิตร

ห้ามเขย่าจนกว่าจะเติม 2N H_2SO_4

เขย่าให้ตะกอนสีแดงของ Cu_2O ละลาย

นำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.005 N $Na_2S_2O_3$ โดยเติม starch indicator 2-3 หยด

คำนวณปริมาณ reducing sugar ในรูปของน้ำตาลกลูโคสจากสูตร

ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร) = 0.1099(ผลต่างของมิลลิลิตรของ 0.005 N $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างกับที่ใช้ไตเตรท blank)+ 0.048

ภาคผนวก ง

วิธีการวิเคราะห์ทางชีววิทยา

1. การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (spread plate/surface plate)

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

1. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานอาหาร ทิ้งไว้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแข็ง
2. เตรียมตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 10^{-2}-10^{-5}
3. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารตามระดับความเจือจาง จานละ 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้ 2 จานในแต่ละความเจือจาง
4. ใช้แท่งแก้วที่ปลายข้างหนึ่งงอเป็นรูปสามเหลี่ยม จุ่มแอลกอฮอล์ ลนไฟ แกว่างเบา ๆ ให้เย็น เกลี่ย (spread) ให้ตัวอย่างอาหารกระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำได้โดยใช้มือหนึ่งช่วยหมุนจาน โดยแตะแท่งแก้วไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. นำจานอาหารไปบ่มเพาะเชื้อและนับจำนวนโคโลนีที่ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก จ

วิธีการฆ่าเชื้อ

1. **ถังหมัก**

เตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 5% เก็บไว้ในภาชนะที่มีฝาปิด เพื่อนำถังหมักลงไปแช่ก่อนใช้ ประมาณ 2-3 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. **สายยางและตัวกรองเชื้อ** (filter)

สายยางซิลิโคนและตัวกรองเชื้อ ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. SCMA matrix

ก่อนใช้ นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

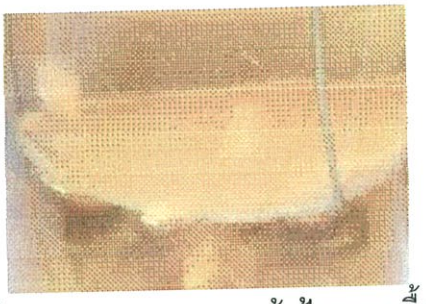
ภาคผนวก ฉ

ภาพการหมัก

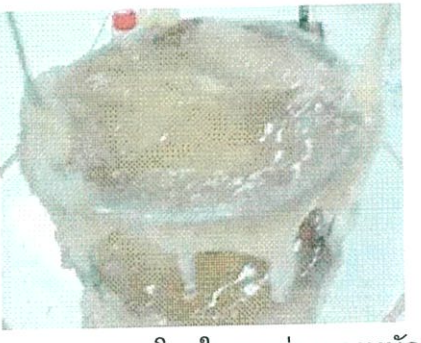
ภาพที่ ฉ1 การหมักเซลลูโลสในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 1.5 ลิตร

ภาพที่ ฉ2 การหมักเซลลูโลสในถังหมักแบบ airlift ปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร

ภาพที่ ฉ3 SCMA matrix (cotton)



ภาพที่ ฉ4 การตรึงเซลล์ด้วย SCMA matrix จากผ้าฝ้ายของเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK



ภาพที่ ฉ5 การ recovery เซลลูโลสในระหว่างการหมักแบบ Repeated Batch

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนิจวรรณ ผลงาม เกิดเมื่อวันที่ 28 มิถุนายน 2518 ที่จังหวัดระยอง ปี พ.ศ. 2542 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปี พ.ศ. 2546 สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง