## การผลิตการ์บอกซีเมทิลเซลลูโลสจากเจลเซลลูโลสโดย Acetobacter xylinum

นางสาวกรวิกา สุขศรีวงษ์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-206-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# CARBOXYMETHYLCELLULOSE PRODUCTION FROM CELLULOSIC GEL BY Acetobacter xylinum

MISS KORNWIKA SUKSRIWONG

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Programme of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
1996
ISBN 974-634-206-1

Thesis Title

CARBOXYMETHYLCELLULOSE PRODUCTION FROM

CELLULOSIC GEL BY Acetobacter xylinum

By

Miss Kornwika Suksriwong

Department

Biotechnology

Thesis Advisor

Sumate Tantratian, Ph.D.

Thesis Co-advisor

Supason Pattanaargsorn, Ph.D.

Associate Professor Warawut Krusong, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Santi Thomasuran Dean of Graduate School

(Professor Sunti Tungsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

S. Kynst Chairman

(Assistant Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

(Sumate Tantratian, Ph.D.)

Sipan. Rollanarove.
Thesis Co-advisor

(Supason Pattanaargsorn, Ph.D.)

1. Knusena . Thesis Co-advisor

(Associate Professor Warawut Krusong, Ph.D.)

(Associate Professor Sophon Roengsumran, Ph.D.)

## พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

กรวิกา สุขศรีวงย์ : การผลิตการ์บอกซีเมทิลเซลลูโลสจากเจลเซลลูโลสโดย
Acetobater xylinum (CARBOXYMETHYLCELLULOSE PRODUCTION FROM
CELLULOSIC GEL BY Acetobater xylinum) อ.ที่ปรึกษา : อ.คร. สุเมธ ตันตระเธียร
อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.คร.สุภศร พัฒนอักษร และ รศ.คร.วราวุฒิ ครูส่ง, 74 หน้า.
ISBN 974-634-206-1

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเจลเซลลูโลสของ A. xylinum และเพื่อศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสจากเจลเซลลูโลส

จากการศึกษาความสามารถในการสร้างเจลเซลลูโลสของ A. xylinum สามสายพันธุ์คือ AGR60 DK และST พบว่า สายพันธุ์ ST เป็นสายพันธุ์ที่สร้างเจลเซลลูโลสไค้สูงสุด สำหรับชนิด ของน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตเจลเซลลูโลสคือ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และ ฟรุกโตส การผลิต เจลเซลลูโลสในอาหารน้ำมะพร้าวให้ปริมาณผลผลิตเจลเซลลูโลสที่สูงกว่าการผลิตในอาหาร สังเคราะห์ โดยขนาดพื้นที่ผิวของอาหารน้ำมะพร้าวที่ใช้เลี้ยง A. xylinum เพื่อให้เชื้อมีความ สามารถในการสร้างเจลเซลลูโลสได้ในปริมาณสูงสุดคือ 168.75 และ 337.5 ตารางเซนติเมตร

ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตการ์บอกซีเมทิลเซลลูโลสจากเจลเซลลูโลสคือ ใช้อัตราส่วนของเจลเซลลูโลสผงต่อน้ำกลั่นคือ 1.0 : 2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) อัตราส่วนของเจลเซลลูโลสผงต่อโซเดียมใสดรอกใชค์ต่อโซเดียมคลอโรอะซีเตทคือ 1.0 : 3.0 : 0.44 โดยน้ำหนัก ทำการผสมส่วนผสมทั้งหมด 6 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิห้อง 36 ชั่วโมง แล้วละลายส่วนผสมในน้ำร้อนโดยใช้อัตราส่วนของส่วนผสมต่อน้ำร้อนคือ 1.0 : 12.5 จากนั้นตกตะกอนค้วยเอธานอล โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 70 จากการศึกษาพบว่าความหนืดของสารละลายของคาร์บอกซีเมทิล เซลลูโลสที่ความเข้มข้นร้อยละ1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่า 334 เซนติพอยส์ และมีค่า องศาการแทนที่เท่ากับ 0.48

ภาควิชา 🚟	โฟลิยีพงที่วภาพ
สาขาวิชา	-
ปีการศึกษา	2733

ลายมือชื่อนิสิต	กะวิเท	สูงเรียวน์		
ลายมือชื่ออาจารย์	์ที่ปรึกษา	BI	me of	
ลายมือชื่ออาจารย์	์ที่ปรึกษาร่ <sup>-</sup>	u Sip	nn.	Portlande

## C626705 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: CETTUTOSIC GET / ACRES CELLULOSIC GEL/Acetobacter xylinum/CARBOXYMETHYLCELLULOSE KORNWIKA SUKSRIWONG : CARBOXYMETHYLCELLULOSE PRODUCTION FROM CELLULOSIC GEL BY Acetobacter xylinum THESIS ADVISOR : SUMATE TANTRATIAN, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: SUPASON PATTANAARGSON, Ph.D., ASSO. PROF. WARAWUT KRUSONG, Ph.D. 74pp. ISBN 974-634-206-1

This research has the objective to study the various factors affecting cellulosic gel production by  $\underline{A}.\underline{xvlinum}$  and to study the optimum conditions of CMC production from cellulosic gel.

Cellulosic gel forming ability of  $\underline{A}.\underline{xylinum}$  was depend upon  $\underline{A}.\underline{xylinum}$  strains. The ST strain could form the highest amount of cellulosic gel when compared with DK and AGR60 strains. The suitable kinds of sugar using as C-source for A.xvlinum were glucose, sucrose and fructose. It was found that the cellulosic gel formation of these three strains in coconut water medium provided the higher yield than in synthetic medium. The surface of medium influenced on the gel forming ability. The maximum cellulosic gel were obtained from the 168.75 and 337.5 cm2 of surface area of medium.

The optimum conditions of CMC production were as followed ; the ratio of nata cellulose powder : distilled water of 1.0:2.0(w/v) and the ratio of nata cellulose powder : NaOH : C1CH2COONa of 1.0:3.0:0.44. The reaction mixture was mixed for 6 hours and incubated at room temperature for 36 hours. The reaction mixture was dissolved in hot water by the ratio of 1.0 :12.5 of the reaction mixture to hot water and precipitated by 70% final concentration of ethanol. The viscosity of 1% of CMC solution at 25°C and DS of CMC obtained were 334 cP and 0.48, respectively.

ภาควิชา เกลโนโลยี mงชีกกพ	ลายมือชื่อนิสิต กลิกา สาศร้องน์
สาขาวิชา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2533	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Spm Parturacy

#### **ACKNOWLEDGEMENT**



I would like to express my deepest gratitude to Dr. Sumate Tantratian, my advisor, Dr. Supason Pattanaargsorn and Associate Professor Dr. Warawut Krusong, my co-advisor for their encouragements, suggestions, supports and helpful guidance throughout my research.

My sincere gratitude is expressed to the chairman committee, Assistat Professor Dr. Sirirat Rengpipat, and the members of thesis committee, Associate Professor Dr. Sophon Roengsumran, for their useful suggestions, advices and encouragements.

I would like to thank Mr.Pramote Tammarate and Institute of Food Research and Development (IFRD) for providing cellulose powder. I wish to express special thanks to Mr. Suthep Yadee and PANA Food Industry Company for providing microorganism; Acetobacter xylinum ST strain. Special thanks are expressed to Department of Agro-Industry, Faculty of Agicultural Technology, King's Mongkut Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) for providing the facilities and equipments in laboratory.

Finally, I wish to express my deepest thanks to my family, all teachers and friends in the Department of Biotechnology who always give me encouragements, understanding, knowledge and friendships.

## CONTENT

	Page
ABSTRACT (THAI)	
ACKNOWLEDGEMENT	III
CONTENT	IV
LIST OF TABLES	VII
LIST OF FIGURES	XI
CHAPTER I INTRODUC	TION
1.1 Introdu	etion1
1.2 Objecti	/es4
	RE REVIEWS AND THEORETICAL CONSIDERATIONS
2.1 Cellulos	se as raw material of carboxymethylcellulose
	ion5
	sic gel production by Acetobacter xylinum9
2.3 Structu	re and properties of carboxymethylcellulose11
2.4 Uses a	and application of carboxymethylcellulose13
	ymethylcellulose production15
	S AND METHODS
3.1 Materia	ls19
	nental equipments21
	nental methods21
3.3	
	gel formation by Acetobacter xylinum21
3.3	
	(CMC) production from cellulosic gel by <i>Acetobacter</i>
	xylinum23
	3 Analysis of product25

	Page
3.3.4	Properties of CMC produced from cellulosic gel
	by A. xylinum26
CHAPTER IV RESULTS ANI	DDISCUSSION
4.1 Studies on	the optimum conditions for cellulosic gel formation
by Acetoba	acter xylinum27
4.1.1	Effect of strains of A. xylinum on their gel formation
	abilities27
4.1.2	Effect of sugar on gel formation of A. xylinum
	strains29
4.1.3	Effect of surface area of fermentation medium
•	on cellulosic gel formation35
4.2 Factors affecting of	n carboxymethylcellulose production37
4.2.1	Effect of cellulosic materials on
	carboxymethylcellulose production37
4.2.2	Effect of ratio of nata cellulose powder to
	distilled water on CMC production39
4.2.3	Effect of ratio of nata cellulose powder to
	sodiumhydroxide on CMC production42
4.2.4	Effect of ratio of nata cellulose powder to
	sodiumchloroacetate on CMC production44
4.2.5	Effect of mixing time on CMC production46
4.2.6	Effect of incubation time on CMC production48
4.2.7	Effect of ratio of reaction mixture to hot water
	on CMC production51
4.2.8	Effect of final concentration of ethanol on CMC
	precipitation52
[1] [2] [2] [2] [2] [2] [2] [2] [2] [2] [2	s of CMC produced from cellulosic gel
by Acetob	pacter xylinum54
4.3.1	Effect of temperature on viscosity of CMC solution54
132	Effect of pH on viscosity of CMC solution 55

		Page
4.3.3	Relationship between CMC concentration and its	
	viscosity	56
CHAPTER V CONCLUSION		60
REFERENCES		62
APPENDIXI		66
APPENDIXII		73
VITA		74

Page

# LIST OF TABLES

Table 2.1	Composition of cellulosic gel from Acetobacter xylinum	9
Table 2.2	Some of synthetic media formulars for Acetobacter xylinum	10
Table 2.3	Typical properties of sodiumcarboxymethylcellulose	
	(Na-CMC)	12
Table 2.4	Some important properties of CMC utilized in	
	different food applications	14
Table 4.1	Thickness and weight of gel formed by three strains of	
	A. xylinum after incubating at 32° C for 14 days in 4L	
	coconut water medium in tray (1 inch of medium depth)	27
Table 4.2	Moisture Content and Cellulose Yield and Cellulose Content	
	in gel formed by three strains of A. xylinum after	
	incubating at 32 °C for 14 days in 4L coconut water	
	medium in tray2	28
Table 4.3	Cellulose content and cellulose yield in gel formed by three	
	strains of A. xylinum in three kinds of sugars added	
	in 150 ml coconut water medium (1 inch of medium depth)	32
Table 4.4	Cellulose Content and Cellulose Yield in gel formed by	
	three strains of A. xylinum in three kinds of sugars added	
	in 150 ml synthetic medium (1 inch of medium depth)	35
Table 4.5	Cellulosic gel yield in cellulosic gel production	
	by A. xylinum ST strain in various size of fermentation trays	
	After 14 days of fermentation time at 32° C in coconut	
	water medium	36

	Page
Table 4.6	Moisture content, cellulose yield and cellulose content in
	cellulosic gel produced by ST strain of A. xylinum in
	various size of fermentation tray after 14 days of
	fermentation time at 32° C in coconut water medium37
Table 4.7	Weight, moisture content, L-value and pH of carboxymethylcellulose
	(CMC) produced by different cellulosic materials38
Table 4.8	Viscosity of 1% CMC solution, degree of substitution(DS)
	and impurities of CMC produced by different
	cellulosic materials38
Table 4.9	Weight, moisture content, L-value and pH of CMC
	produced by different ratio of nata cellulose powder to distilled
	water (w/v)40
Table 4.10	Viscosity, DS and impurities of CMC produced by different
	ratio of nata cellulose powder to distilled water (w/v)41
Table 4.11	Weight, moisture content, L-value and pH of CMC produced by
	different ratio of nata cellulose powder to sodiumhydroxide (w/w)42.
Table 4.12	Viscosity, DS and impurities of CMC produced by different
	ratio of nata cellulose powder to sodiumhydroxide (w/w)43
Table 4.13	Weight, moisture content, L-value and pH of CMC produced by
	different ratio of nata cellulose powder to sodiumchloroacetate
	(w/w)45
Table 4.14	Viscosity, DS and impurities of CMC produced by different
	ratio of nata cellulose powder to sodiumchloroacetate (w/w)45
Table 4.15	Weight, moisture content, L-value and pH of CMC produced by
	various mixing time47
Table 4.16	Viscosity, DS and impurities of CMC produced by various
	mixing time47
Table 4.17	Weight, moisture content, L-value and pH of CMC produced by
	various incubation time49
Table 4.18	Viscosity, DS and impurities of CMC produced by various
	incubation time

		Page
Table 4.19	Weight, moisture content, L-value and pH of CMC produced	
	by different ratio of reaction mixture to hot water (w/v)	51
Table 4.20	Viscosity, DS and impurities of CMC produced by different	
	ratio of reaction mixture to hot water (w/v)	52
Table 4.21	Weight, moisture content, L-value and pH of CMC produced by	
	different final concentration of ethanol	53
Table 4.22	Viscosity, DS and impurities of CMC produced by different	
	final concentration of ethanol	54

### LIST OF FIGURES

	rayı
Figure 1.1	World-wide usage pattern for carboxymethylcellulose3
Figure 2.1	Structural formular for cellulose6
Figure 2.2a	Scanning electron micrograph of a network of
	ribbons in gelatinous material, Acetobacter xylinum
	are entrapped with the network8
Figure 2.2b	Transmission electron micrograph of bacterial cellulose ribbon
	produced by Acetobacter xylinum8
Figure 2.2c	Microfibrillar stucture of cotton as revealed under
	transmission electron microscope8
Figure 2.2d	Fibrillar model8
Figure 2.3	Proposed regulatory control pathay of cellulose synthase10
Figure 2.4	The structure of carboxymethylcellulose molecule11
Figure 2.5	Principal steps in technical production of carboxymethylcellulose17
Figure 4.1	The cellulosic gel formed by three strainsof A. xylinum;
	AGR60, DK and ST; in coconut water medium with various
	type of sugars: SUC, sucrose; MAL, maltose; LAC, lactose;
	GLU, glucose; FRU, fructose and CTR, control (no sugar addition)
	after incubation at 32 °C for 14 days, under static condition
	(a) thickness, (b) wet weight and (c) dry weight30
Figure 4.2	The cellulosic gel formed by three strains of A. xylinum;
	AGR60, DK and ST; in synthetic medium with various type
	of sugars: SUC, sucrose; MAL, maltose; LAC, lactose;
	GLU, glucose; FRU, fructose and CTR, control (no sugar addition)
	after incubation at 32 °C for 14 days, under static condition
	(a) thickness, (b) wet weight and (c) dry weight34
Figure 4.3	Relationship between viscosity(cP) and temperature of CMC
	solution
Figure 4.4	Relationship between viscosity (cP) and pH of CMC solution56
Figure 4.5	Relationship between concentration of CMC and its viscosity(cP)57