บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาแนวทางการผลิตเซลลูโลสในภาวะที่มีการกวนให้อยู่ในรูปเม็ด(pellet) โดยได้ปรับปรุงขั้นตอนการผลิตให้ลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และพยายามพัฒนารูปร่างของเซลลูโลสที่ผลิตได้ในภาวะที่มีการกวนให้มีรูปร่างเป็นเม็ด (pellet) เพื่อที่จะสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆได้ง่าย โดยคัดเลือก *Acetobacter xylinum* จากจำนวน 4 สายพันธุ์คือ *A. xylinum* สายพันธุ์ ATCC 23747, 23769, 23770 และ 53263(Johnson and Neogi,1989) พบว่า *A. xylinum* สายพันธุ์ ATCC 53263 สามารถผลิตเซลลูโลสได้ดีที่สุดในขวดรูปชมพู่จึงเลือกไว้สำหรับงานวิจัยขั้นต่อไป โดยทั่วไปเมื่อเลี้ยง *A.xylinum* บนอาหารแข็งลาดเอียงเชื้อจะสร้างเซลลูโลสไปพร้อมกับการเจริญ ทำให้เกิดเป็นแผ่นของเซลลูโลสที่มีเซลล์ติดอยู่ด้วยบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการทำเซลล์แขวนลอยเพื่อนำมาใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ ในปี ค.ศ. 1989 Johnsonและ Neogi ได้รายงานว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลส จึงได้แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นฟรุกโทส แมนนิทอล กลูโคส ซอร์บิทอล กาแลกโทส แลกโทส มอลโทส ซูโครส และกลีเซอรอล พบเมื่อใช้กลีเซอรอลปริมาณ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้เซลล์แขวนลอยดีที่ โดยทั่วไปเมื่อเลี้ยง *A. xylinum* ในขวดเขย่าจะได้ลักษณะเซลลูโลสเป็นก้อนเมื่อจะทำให้เป็นเซลล์แขวนลอยจะต้องนำไปผ่านเครื่อง homogenizer(Johnson and Neogi,1989) ในงานวิจัยนี้ได้ปรับปรุงวิธีการเตรียมหัวเชื้อเพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากภายนอก ในปี ค.ศ. 1996 Mutsuokaและคณะได้รายงานวิธีการวัดการเจริญของ *A. xylinum* โดยการใช้เอนไซม์เซลลูเลสย่อยเซลลูโลสเพื่อแยกเซลล์ก่อนนำไปหาปริมาณเซลล์ จึงได้นำแนวความคิดนี้มาประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงเซลล์เพื่อเตรียมหัวเชื้อโดยเติมเอนไซม์เซลลูเลสลงในอาหารเตรียมหัวเชื้อ พบว่าปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมเท่ากับ 0.18 หน่วยต่อ 50 มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถยับยั้งไม่ให้เกิดก้อนเซลลูโลสในอาหารเหลว องค์ประกอบของอาหารเตรียมหัวเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยง *A.xylinum* คือสูตร F-4 (ภาคผนวก ก 2.6) ส่วนการผลิตเซลลูโลสในระดับขวดเขย่าลักษณะของเซลลูโลสที่ได้จะเป็นก้อนขนาดใหญ่แต่ไม่เป็นเม็ด (pellet) จึงเปลี่ยนมาผลิตเซลลูโลสในถังหมัก 5 ลิตรที่มีระบบการกวน พบว่าลักษณะของเซลลูโลส

ที่ได้เป็นเม็ด(pellet) ขนาด 1 มิลลิเมตรเกือบเท่ากันทั้งหมด แต่ต้องการเพิ่มขนาดของเซลลูโลสจึงได้ลดอัตราการกวนให้เหลือเพียง 250 รอบต่อนาที เพื่อลดแรงเฉือนในถังหมัก แต่เนื่องจาก *A. xylinum* เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณเซลลูโลสลดลงอย่างมากแต่ขนาดของเซลลูโลสที่ได้ก็ไม่เพิ่มขึ้นคือมีขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร

เนื่องจากต้องการปรับองค์ประกอบของอาหารสำหรับการผลิตเซลลูโลสในถังหมัก 5 ลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์และเซลลูโลส เพราะว่าการเจริญของ *A.xylinum* จะสัมพันธ์กับการผลิตเซลลูโลส เมื่อเชื้อเจริญมากจะผลิตเซลลูโลสมากขึ้นด้วย จึงแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ เพปโทน แมกนีเซียมซัลเฟต แอมโมเนียมซัลเฟตและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในอาหาร F-4 (ภาคผนวก ก 2.6) พบว่าปริมาณองค์ประกอบที่เหมาะสมคือในอาหารปริมาตร 1 ลิตรประกอบด้วย

กลูโคส	20 กรัม
สารสกัดจากยีสต์	6 กรัม
เพปโทน	3 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	2 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	5 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3 กรัม

อาหารสูตรที่ได้ปรับองค์ประกอบให้เหมาะสมนี้คืออาหารเหลว F-6 (ภาคผนวก ก 2.8)ซึ่งแตกต่างจากอาหาร F-4 (ภาคผนวก ก 2.6) ที่ปริมาณสารสกัดจากยีสต์เพียงอย่างเดียว และพบว่าหลังชั่วโมงที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นช้ามาก จึงน่าจะเก็บผลในชั่วโมงที่ 28 ของการเลี้ยง

ในสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบของ corn steep liquor จะให้การเจริญและการผลิตเซลลูโลสที่ดีซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาเบื้องต้นและรายงานของ Johnson และ Neogi (1989) แต่สำหรับการผลิตในประเทศไทยการใช้ corn steep liquor จะทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ในงานวิจัยนี้จึงทดลองทำน้ำแช่ข้าวโพดจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์(ภาคผนวก ก 3) มาใช้แทน corn steep liquor และเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้เมื่อใช้อาหาร CSL-1 (ใช้ corn steep liquor ทางการค้า) และ CSL-2(ใช้น้ำแช่ข้าวโพดที่เตรียมขึ้นเอง)(ภาคผนวก ก 2.10,2.11) พบว่าอาหาร CSL-1 ได้ปริมาณเซลล์และเซลลูโลสที่มากกว่าอาหาร CSL-2 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะชนิดของข้าวโพดที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบต่างกัน จึงมีองค์ประกอบในน้ำแช่ข้าวโพดที่แตกต่างกัน

จากอาหาร F-6 ที่ได้ปรับองค์ประกอบแล้วพบว่าปริมาณน้ำตาลที่เหลือในชั่วโมงที่ 24 เหลืออยู่ 4.59 กรัมต่อลิตร จึงทดลองควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสให้คงที่ไว้ประมาณ 8 และ 10 กรัมต่อลิตรโดยการเติมน้ำตาลอย่างต่อเนื่อง พบว่าเมื่อควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสให้คงที่ประมาณ 8

กรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณเซลล์และเซลลูโลสใกล้เคียงกับเมื่อควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสให้คงที่ประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณเซลลูโลสในชั่วโมงที่ 36 จะใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ 40,44 ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสเมื่อควบคุมระดับน้ำตาลควรจะอยู่ที่ชั่วโมงที่ 36