

การผลิตเซลล์โลสจาก *Acetobacter* sp. TISTR 975

โดยใช้ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน



นายบุญฤทธิ์ ฤทัยคงถาวร

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4106-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF CELLULOSE FROM *Acetobacter* sp. TISTR 975
USING ROTATING DRUM FERMENTER

Mr.Boonyarit Ruthaikongtaworn



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-4106-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตเซลล์ลูไลสจาก *Acetobacter* sp. TISTR 975 โดยใช้ถังหมัก
ทรงกระบอกแบบหมุน
โดย นายบุญฤทธิ์ ฤทัยคงถาวร
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร.ชิตพงษ์ ประดิษฐ์สุวรรณ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นเป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงษ์ นวังคส์ตฤศาศน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.ชิตพงษ์ ประดิษฐ์สุวรรณ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บุญฤทธิ์ ฤทัยคงถาวร : การผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter* sp. TISTR 975 โดยใช้ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน (PRODUCTION OF CELLULOSE FROM *Acetobacter* sp. TISTR 975 USING ROTATING DRUM FERMENTER) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุเมธ ตันตระเจียร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.ดร.ชิตพงศ์ ประดิษฐ์สุวรรณ ; 99 หน้า. ISBN 974-17-4106-5

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนขนาดบรรจุปริมาตร 5.6 ลิตร พบว่า การใช้ความเร็วรอบในการหมุนถังหมักที่ 5 รอบต่อนาที ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 0.25 และปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 ลิตร ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด และเมื่อความเร็วในการหมุนถังหมัก ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้ผลผลิตเซลลูโลสลดลง เนื่องจากเชื้อมีพฤติกรรมในการสร้างกรดแทนการสร้างเซลลูโลสเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตเซลลูโลสของสภาวะที่ใช้ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนกับสภาวะนิ่ง และพบว่า สภาวะถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนมีผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าสภาวะอื่น โดยมีค่าเท่ากับ 5.69 กรัมต่อลิตร ส่วนสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่ามีค่าเท่ากับ 3.90 และ 2.64 กรัมต่อลิตร ($p \leq 0.05$) ตามลำดับ จากการศึกษพบว่าอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนของสภาวะทั้ง 3 แตกต่างกัน และเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้มีอัตราการผลิตเซลลูโลสที่ต่างกัน โดยสภาวะในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนมีค่าอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนเท่ากับ 0.1160 มิลลิกรัมออกซิเจน(ลิตร นาที)⁻¹ ในขณะที่สภาวะนิ่งมีค่าดังกล่าวต่ำสุดเท่ากับ 2.65×10^{-4} มิลลิกรัมออกซิเจน(ลิตร นาที)⁻¹ และสภาวะเขย่ามีค่าดังกล่าวสูงสุดเท่ากับ 0.2526 มิลลิกรัมออกซิเจน (ลิตร นาที)⁻¹ เมื่อค่าอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนสูง ทำให้ค่าการละลายออกซิเจนในน้ำหมักมีสูงตามไปด้วย เป็นผลต่อจำนวนเซลล์และการสร้างเซลลูโลส และทำให้ระบบการหมักเกิดกรดกลูโคนิกในปริมาณที่สูงเนื่องจากปฏิกิริยาไกลโคสออกซิเดชัน ในขณะที่ค่าการละลายออกซิเจนต่ำส่งผลให้เชื้อมีการเจริญที่ช้า และสารอาหารน้ำตาลถูกใช้ในปรับสภาพเซลล์ในระยะปรับตัว

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2546.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4372312023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD : CELLULOSE PRODUCTION / *ACETOBACTER* sp. TISTR 975 /
ROTATING DRUM FERMENTER

BOONYARIT RUTHAIKONGTAWORN : PRODUCTION OF CELLULOSE
FROM *ACETOBACTER* sp. TISTR 975 USING ROTATING DRUM
FERMENTER .

THESIS ADVISOR : ASSIST.PROF.SUMATE TANTRATRIAN, Ph.D.,

THESIS COADVISOR : CHIDPHONG PRADISTSUWANA, Ph.D. 99 pp.

ISBN 974-17-4106-5

The aim of this study was to find factors effecting the cellulose production by *Acetobacter* sp. TISTR 975 in a rotating drum fermenter. The result showed that 5 rpm of rotation speed, 10 % inoculums, carbon-nitrogen ratio of 0.25 and 1.5 litres of medium gave the highest cellulose production. When the factors as rotation speed, inoculums and carbon-nitrogen ratio of 0.25 increased, the cellulose production decreased while the acid production was increased. The cellulose production in different condition such as in rotating drum fermentation, still and shake condition was found that the rotating drum fermentation gave the highest cellulose production at 5.69 g/l, while in still and shake condition were 3.90 and 2.64 g/l, respectively. The oxygen transfer rate of rotating drum fermentation, still and shake condition at 0.1160, 2.65×10^{-4} and 0.2526 $\text{mgO}_2(\text{l}.\text{min})^{-1}$, respectively had effected on cellulose production. The high oxygen transfer rate resulted in the increasing of dissolved oxygen in medium. The excessive oxygen in the medium caused an increasing of bacterial number and gluconic acid producing while low dissolved oxygen in the medium caused longer lag phase.

Department.....Food..Technology.....Student's signature.....

Field of study.....Food..Technology.....Advisor's signature.....

Academic year.....2003.....Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญาโทและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร.ชิตพงษ์ ประดิษฐ์สุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำวิจัย ปรับปรุงผลงาน ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้และกำลังใจที่มีให้ผู้วิจัย ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่าน ไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงษ์ นวังคส์ตฤศาสน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คุณสมศรี ประชาศักดิ์ ตลาดบางลำภู ที่เอื้อเฟื้อน้ำมะพร้าวแก่สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบตลอดการทดลอง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน ที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่และห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ นางสาวสายสุนีย์ เบญจเทพานันท์ นางสาววชิรา กะเตื่องงาน นางสาวกฤษณาภรณ์ คำแสงดี นายธนพรรัช ภิญญธนาบัตร และเพื่อนๆ ไปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร สถาบันราชภัฏสวนดุสิต รุ่น 3 ที่เป็นกำลังใจและคอยห่วงใยเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ และน้องๆ นิสิตปริญญาโททุกท่านที่ช่วยขณะทำการทดลอง และให้กำลังใจ

ขอกราบขอบคุณคุณปุเปซร เชียงเห็น และคุณอานิพนธ์ ฤทัยคงถาวร ที่ช่วยสร้างและแก้ไขถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อประพัทธ์-คุณแม่สุรัช ฤทัยคงถาวร ผู้ให้การเลี้ยงดูอบรม และส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา และขอบคุณน้องสาว นางสาวกนกวรรณ ฤทัยคงถาวร และนางสาวประภาศรี ฤทัยคงถาวร ที่เป็นกำลังใจให้เสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทัศน์	3
2.1 เซลลูโลส	3
2.2 เซลลูโลสจาก <i>Acetobacter xylinum</i>	3
2.3 การสังเคราะห์เซลลูโลสของ <i>A. xylinum</i>	6
2.4 การนำเซลลูโลสจาก <i>A. xylinum</i> ไปใช้ประโยชน์.....	10
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ <i>Acetobacter xylinum</i>	11
2.6 การหมักเพื่อผลิตเซลลูโลสด้วย <i>Acetobacter xylinum</i>	20
3. วิธีการทดลอง.....	25
3.1 แบบที่เรียกใช้ในการทดลอง.....	25
3.2 วัตถุประสงค์และสารเคมี.....	25
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย.....	26
3.4 ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน.....	26
3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	27
3.5.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	27
3.5.2 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเซลลูโลสของ <i>Acetobacter sp.</i>	
TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน.....	28

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3.5.3 การศึกษาเปรียบเทียบการสร้างเซลล์ไลสของ <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนกับสภาวะนิ่ง และเขย่า.....	31
4. ผลการทดลองและวิจารณ์.....	32
4.1 ผลของความเร็วยรอบต่อการสร้างเซลล์ไลสของ <i>Acetobacter</i> sp.TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน.....	32
4.2 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการสร้างเซลล์ไลสของ <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน.....	42
4.3 ผลของปริมาณสารประกอบไนโตรเจนต่อการสร้างเซลล์ไลสของ <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน.....	48
4.4 ผลของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างเซลล์ไลสของ <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน.....	54
4.5 ผลของสภาวะการหมักต่อการสร้างเซลล์ไลสของ <i>Acetobacter</i> sp.TISTR 975.....	59
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	73
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	73
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	73
รายการอ้างอิง.....	74
ภาคผนวก.....	81
ภาคผนวก ก.....	82
ภาคผนวก ข.....	83
ภาคผนวก ค.....	90
ภาคผนวก ง.....	95
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	99

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของแผ่นวุ้นเซลล์ูโลสจาก <i>Acetobacter xylinum</i>	6
2 แหล่งคาร์บอนสำหรับ <i>A. xylinum</i>	13
3 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อความเร็วรอบในการหมุน ถึงหมักต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส).....	41
4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้น ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส).....	47
5 ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ของชุดการทดลอง.....	48
6 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส).....	53
7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูง และพื้นที่ผิวในการสัมผัส อากาศของอาหารเลี้ยงเชื้อและผนังถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน.....	54
8 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อแปรปริมาณอาหาร เลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส).....	58
9 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของปริมาณอาหารต่อพื้นที่ผิวของอาหารที่สัมผัส อากาศ กับผลผลิตเซลล์ูโลส.....	58
10 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อสภาวะการหมักต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)	66
11 ขนาดโพรง ขนาดเซลล์ และขนาดเส้นใยเซลล์ูโลส จากสภาวะการหมักต่างๆ ณ วันที่ 7.....	69
ภาคผนวก	
ค.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าน้ำหนักเปียก ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณ กรดกลูโคนิก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ผลผลิตเซลล์ูโลสต่อ 100 กรัม น้ำตาลที่ใช้ และผลผลิต เซลล์ูโลสต่อปริมาณอาหารเหลว น้ำมะพร้าว 1 ลิตร ของ <i>Acetobacter sp.</i> TISTR 975 เมื่อ แปรความเร็วรอบในการหมุนถึงหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	90

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าน้ำหนักเปียก ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณกรดกลูโคสิก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ผลผลิตเซลล์ไลสต่อ 100 กรัม น้ำตาลที่ใช้ และผลผลิตเซลล์ไลสต่อปริมาตรอาหารเหลว น้ำมะพร้าว 1 ลิตร ของ <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้นในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ความเร็วรอบ 5 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	91
ค.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าน้ำหนักเปียก ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณการใช้ไนโตรเจน ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ผลผลิตเซลล์ไลสต่อ 100 กรัม น้ำตาลที่ใช้ และผลผลิตเซลล์ไลสต่อปริมาตรอาหารเหลว น้ำมะพร้าว 1 ลิตร ของ <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 เมื่อแปรอัตราส่วน C:N ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ความเร็วรอบ 5 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	92
ค.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าน้ำหนักเปียก ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ผลผลิตเซลล์ไลสต่อ 100 กรัม น้ำตาลที่ใช้ และผลผลิตเซลล์ไลสต่อปริมาตรอาหารเหลว น้ำมะพร้าว 1 ลิตร ของ <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 เมื่อแปรปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ความเร็ว 5 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	93
ค.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าน้ำหนักเปียก ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณกรดกลูโคสิก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ผลผลิตเซลล์ไลสต่อ 100 กรัม น้ำตาลที่ใช้ และผลผลิตเซลล์ไลสต่อปริมาตรอาหารเหลว น้ำมะพร้าว 1 ลิตร ของ <i>Acetobacter</i> sp. TISTR975 ในสภาวะถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน สภาวะนิ่ง และเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	94

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส.....	3
2 การเปรียบเทียบลักษณะเส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรียกับเส้นใยในพืชชั้นสูง โดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope.....	5
3 วิธีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ และสารอนุพันธ์ของกรดอินทรีย์.....	7
4 วิธีชีวเคมีของการผลิตเซลลูโลสของ <i>Acetobacter xylinum</i>	9
5 กลไกการสังเคราะห์เซลลูโลสโดย cellulose synthase.....	9
6 การรวมตัวของเส้นใยเซลลูโลสจาก <i>Acetobacter xylinum</i>	10
7 ยีนควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลสบนไซโตพลาสซึมเมมเบรน.....	15
8 ลักษณะการพันของเส้นใยเซลลูโลสของ <i>Acetobacter xylinum</i>	16
9 ตำแหน่งตะแกรงลวดสำหรับศึกษาบริเวณที่ <i>A. xylinum</i> จะสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลส.....	21
10 ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน.(Rotating drum fermenter).....	27
11 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln [C^*-C_t]$ กับ เวลา (นาที) ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวเมื่อแปร ความเร็วในการหมุนถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน	33
12 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน (OTR) ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว กับความเร็วในการหมุนถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน.....	33
13 ค่าการละลายของออกซิเจน (dissolved oxygen) ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว เมื่อแปรความเร็วรอบในการหมุนถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....	34
14 การเพิ่มจำนวนของเชื้อในรูป viable cell numbers เมื่อแปรความเร็วรอบในการหมุน ถังหมัก ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน	35
15 การใช้น้ำตาลของเชื้อ เมื่อแปรความเร็วรอบในการหมุนถังหมัก ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศา เซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน	36
16 pH และ acid content ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว เมื่อแปรความเร็วรอบในการหมุน ถังหมัก ที่อุณหภูมิ (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....	37

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
17 ปริมาณกรดกลูโคโคนิกที่เชื้อสร้างขึ้น เมื่อแปรความเร็วรอบในการหมუნถังหมัก ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....	38
18 ผลผลิตเซลล์ลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรความเร็วในการหมუნถังหมัก ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)	38
19 อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลล์ลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรความเร็วใน การหมუნถังหมัก ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)	39
20 แผ่นวุ้นเซลล์ลูโลสของ <i>Acetobater</i> sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน.....	40
21 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจน (K_La) กับผลผลิตเซลล์ลูโลส เมื่อใช้ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน.....	42
22 การเพิ่มจำนวนของเชื้อในรูป viable cell numbers เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้น ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....	43
23 การใช้น้ำตาลของเชื้อ เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้น ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....	43
24 pH และ acid content ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว เมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้น ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....	44
25 ปริมาณกรดกลูโคโคนิกที่เชื้อสร้างขึ้น เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้น ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....	45
26 ผลผลิตเซลล์ลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้นในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ของการหมัก ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส).....	46
27 อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลล์ลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้นใน ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส).....	46
28 การใช้น้ำตาลของเชื้อ เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....	49
29 การเพิ่มจำนวนของเชื้อในรูป viable cell numbers เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....	50

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
30	pH และ acetic acid content ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....50
31	การใช้ไนโตรเจน เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ณ วันที่ 7.....51
32	ผลผลิตเซลลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส).....52
32	อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)52
34	การเพิ่มจำนวนของเชื้อในรูปแบบ viable cell numbers เมื่อแปรปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....55
35	การใช้น้ำตาลของเชื้อ เมื่อแปรปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....55
36	pH และ acid content ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว เมื่อแปรปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....56
37	ผลผลิตเซลลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)57
38	อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)57
39	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln [C^*-C_t]$ กับ เวลา (นาที) ของแต่ละสภาวะการหมัก.....60
40	ค่าการละลายของออกซิเจน เมื่อแปรสภาวะการหมัก ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....60
41	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell numbers) ของ <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว และ ผลผลิตเซลลูโลส (cellulose production) ในสภาวะการหมักที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....61
42	ค่าความขุ่น (Optical density ; OD) ที่ความยาวคลื่น 660 เมื่อเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 ในสภาวะถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน หนึ่งและเขย่า.....62

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
43	pH และ acid content ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว เมื่อเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 ในสภาวะที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....62
44	การใช้น้ำตาลของเชื้อ เมื่อเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 ในสภาวะที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....63
45	ปริมาณกรดกลูโคนิกที่เชื้อสร้างขึ้นเมื่อสภาวะการหมักต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....64
46	ผลผลิตเซลล์ลูลิส ณ วันที่ 7 ของ <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 เมื่อสภาวะการหมักต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)65
47	อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลล์ลูลิสของ <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 เมื่อสภาวะการหมักต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....65
48	ลักษณะทางกายภาพของวุ้นเซลล์ลูลิส.....68
49	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของแผ่นวุ้นเซลล์ลูลิสที่สร้างจาก <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975.....70
50	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงขนาดเซลล์ของ <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 97571
51	การกระจายของขนาดรูโพรงในร่างแหวุ้นเซลล์ลูลิสจากสภาวะการหมักต่างกัน.....72
52	syneresis ของวุ้นเซลล์ลูลิสที่ได้จากหมักในในสภาวะถึงหมักทรงกระบอกแบบหมุน สภาวะนิ่ง และเขย่า.....72
ภาคผนวก	
ข.1	กราฟมาตรฐานกรดกลูโคนิก.....85
ข.2	โครมาโตแกรมของกรดกลูโคนิก.....85
ข.3	กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส.....86
ข.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln [C^*-C_t]$ กับเวลา ค่าความชันเท่ากับ $-K_d a$88
ง.1	ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนบนแท่นหมุน.....95
ง.2	ตัวถังหมักทรงกระบอกขนาด 20.8 x 33 เซนติเมตร.....95

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
ง.3 ภายในถังหมักทรงกระบอก.....	96
ง.4 ด้านในของฝาถังหมัก.....	96
ง.5 ด้านนอกของตัวฝาถังหมัก.....	97
ง.6 ฝาปิดเปิดของช่องสำหรับสูมตัวอย่าง.....	97
ง.7 ยางโอริงสำหรับปิดฝาให้สนิท.....	98
ง.8 แทนหมุนของถังหมัก ประกอบด้วย มอเตอร์ ท่อสำหรับกึ่งและสวิทช์ เปิด-ปิดเครื่อง.....	98



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เซลลูโลส (cellulose) เป็นไบโอโพลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในโครงสร้างของพืช พืชแต่ละชนิดมีปริมาณเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกัน ในต้นฝ้าย (cotton) มีประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ปอ (flax) มีประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และในไม้ยืนต้นมี 40-50 เปอร์เซ็นต์ (Coffey and Bell, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่า สาหร่ายทะเล และเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์ได้ เช่น *Achromobacter* *Agrobacterium* *Pseudomonas* *Rhizobium* *Sarcina* และ *Acetobacter* (Asai, 1968 ; Valla, 1995) การแยกสกัดเซลลูโลสจากพืชมาใช้ประโยชน์ต้องผ่านกระบวนการทางเคมีหลายขั้นตอน ใช้ระยะเวลา สารเคมี และพลังงานจำนวนมาก (Furda, 1977 ; Tammarate, 1999) ดังนั้นเพื่อเป็นการลดปัญหาดังกล่าว จึงมีการพัฒนานำเซลลูโลสจากแหล่งอื่นมาใช้เป็นวัตถุดิบในการแยกสกัดเซลลูโลส นอกจากนี้เซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* หรือเรียกอีกอย่างว่าแบคทีเรียลเซลลูโลส (bacterial cellulose) เป็นอีกแหล่งที่น่าสนใจ เพราะแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตเซลลูโลสที่บริสุทธิ์แตกต่างจากพืช คือปราศจากองค์ประกอบที่เป็น ลิกนิน (lignin) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และ เพคติน (pectin) เมื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการแยกสกัดเซลลูโลสทำให้สามารถลดระยะเวลา ปริมาณสารเคมี และพลังงาน และปัจจัยอีกอย่างที่น่าสนใจคือ กระบวนการผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter xylinum* ได้นำวัตถุดิบที่เหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมคือ น้ำมะพร้าวมาเป็นแหล่งอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิต และมีความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์

Acetobacter xylinum เป็นเชื้อในกลุ่ม acetic acid bacteria มีความสามารถในการสร้างเส้นใยเซลลูโลสที่มีลักษณะเหมือนกับเส้นใยที่ได้จากพืช แต่มีขนาดที่เล็กกว่า (Yoshinaga et al., 1997) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย (Ross et al., 1991) การผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* มีหลายวิธี ได้แก่ การผลิตแบบสภาวะนิ่ง (static culture) (Scharamn and Hestrin, 1954 ; Dudman, 1960 ; วราวุฒิ ครูสง และคณะ, 2535) การผลิตโดยใช้ถังหมักแบบมีใบกวน หรือสภาวะเขย่า (Toyosaki et al., 1995 ; Kouda et al., 1997) การผลิตโดยใช้ถังหมักแบบ air lift (Chao et al., 2000) และการผลิตแบบ 2-stage fermentation (Okiyama et al., 1992) เป็นต้น ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* มีอยู่หลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ สารอาหารคาร์บอน สารประกอบไนโตรเจน และภาวะการแปรผันของเชื้อ เป็นต้น ปัจจัยอีกอย่างที่สำคัญคือ ปริมาณอากาศหรือออกซิเจนในกระบวนการผลิต

เนื่องจาก *Acetobacter xylinum* เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (obligately aerobic) Dudman (1960) พบว่าการผลิตเซลลูโลสแบบสภาวะนิ่ง จะถูกจำกัดปริมาณอากาศหรือออกซิเจนเนื่องจากแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่สร้างขึ้น ปริมาณออกซิเจนจะลดลงจนเท่ากับศูนย์ เมื่อระยะเวลาในการผลิตเท่ากับ 6-7 ชั่วโมง (Phunsri et al., 2003) ส่งผลให้ผลผลิตเซลลูโลสต่ำกว่าการผลิตเซลลูโลสโดยใช้ถังหมัก ที่สามารถควบคุมปัจจัยดังกล่าวได้ แต่การผลิตโดยใช้ถังหมักที่ใบกวนหรือใบพัดเพื่อเพิ่มการถ่ายโอนออกซิเจนในระบบ ส่งผลให้วุ้นเซลลูโลสมีลักษณะเป็น pellet ทำให้การนำไปใช้ประโยชน์ทำได้ยาก และปริมาณออกซิเจนที่ให้แก่ระบบมากเกินไป ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสไปเป็นกรดมีมาก (Qazi et al., 1993 ; Hwang et al., 1999 ; อังคณา พันธุ์ศรี, 2540) ส่งผลทำให้ผลผลิตเซลลูโลสลดลง ดังนั้นการพัฒนากการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* เพื่อให้ได้ผลผลิตเซลลูโลสที่มีลักษณะแบบเดียวกับสภาวะนิ่ง และในระหว่างกระบวนการผลิตมีการถ่ายโอนออกซิเจนตลอดเวลา สามารถทำได้โดยใช้ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน (rotating drum fermenter) (Tanaka et al., 1983) เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเส้นใยเซลลูโลสเกาะที่ผนังของถังได้ (Krystynowicz et al., 2002 ; Serafica et al., 2002) ทำให้เชื้อสามารถสัมผัสกับอากาศไปพร้อมกับใช้สารอาหารที่บริเวณผิวหน้าแผ่นวุ้นเซลลูโลส การนำเซลลูโลสไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ นำไปใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหารเพื่อเพิ่มกากใยในอาหาร (fibrous additive) โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์ประเภท low-calorie food ใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด (thickener) และใช้เป็นสารทดแทนไขมัน (fat replacer) การใช้ส่วนใหญ่อยู่ในรูปอนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose derivative) ได้แก่ methylcellulose hydroxypropylcellulose hydroxypropylmethylcellulose powdered cellulose และ microcrystalline cellulose (MCC) (Townesley, 1998) เป็นต้น (Lucca and Tepper, 1994)

สำหรับงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน (rotating drum fermenter) และเปรียบเทียบลักษณะการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อกับสภาวะนิ่งและเขย่า เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum*

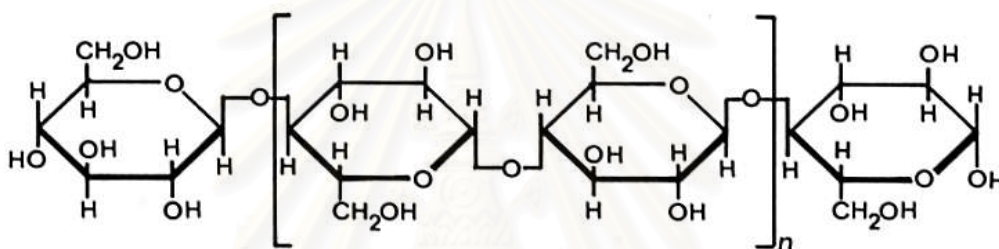
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลส เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีชื่อทางเคมีว่า 1,4- β -D-polyanhydroglucopyranose โครงสร้างของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส 15-40,000 หน่วย ต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β -(1,4) glycosidic (รูปที่ 1) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบของเซลลูโลสซึ่งมีค่าประมาณ 1,500,000 ดาลตัน (Brown et al, 1976)



รูปที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส

ที่มา : Coffey and Bell, (1995)

2.2 เซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum*

Acetobacter aceti subsp. *xylinum* หรือ *Acetobacter xylinum* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Acetic acid bacteria ที่ได้รับความสนใจในการนำมาผลิตเซลลูโลสในระดับอุตสาหกรรม *A. xylinum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์มีลักษณะรูปร่างยาวรี (rod) อาจเป็นท่อนตรงหรือโค้ง อยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสาย ขนาดเซลล์กว้างประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน ยาวประมาณ 1.0-1.4 ไมครอน ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ต้องการอากาศในการเจริญ โดยใช้ ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการเปลี่ยนสารอาหารให้เป็นพลังงานสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase enzyme) สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือพีเอชประมาณ 5.4-6.3 และอุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถออกซิไดซ์เอธานอลไปเป็นกรดอะซิติก และออกซิไดซ์กรดอินทรีย์ประเภทอะซิเตท และแลคเตท เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นสารประเภท

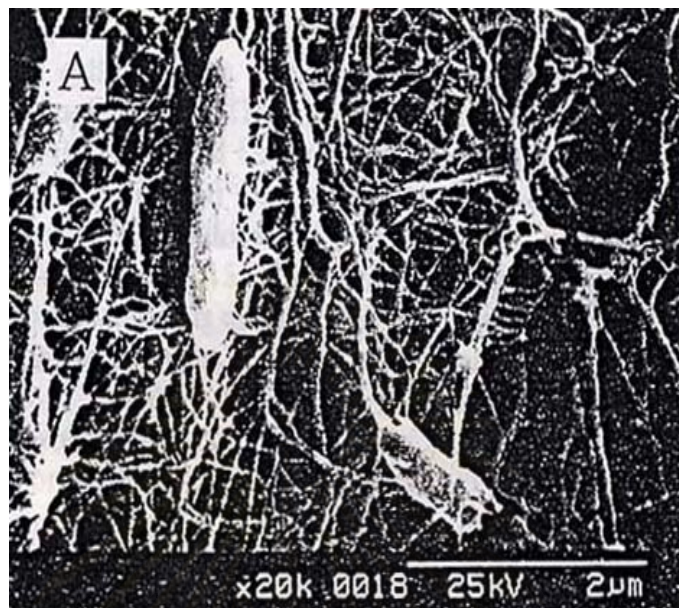
เอทานอล แลคเตท กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส แมนนิทอล และอะราบิโนส ในระหว่างการเจริญของเชื้อชนิดนี้จะมีการสร้างเส้นใยเซลลูโลสซึ่งจัดเป็น primary metabolic product คุณสมบัติที่สามารถทำลายเชื้อชนิดนี้คือ 65-70 องศาเซลเซียส (Breed et al., 1957 ; Asai,1968) เส้นใยเซลลูโลสที่ *A. xylinum* สร้างขึ้นจะมีลักษณะเป็นแผ่นวุ้นสีขาว หรือครีมลอยอยู่ที่ผิวหน้าของอาหาร

จากการศึกษาโดยใช้วิธี X-ray diffraction พบว่า โครงสร้างของเซลลูโลสจาก *A. xylinum* ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า microfibril มีขนาดความกว้างประมาณ 1-25 นาโนเมตร ประกอบไปด้วยสาย polyglucosan ตั้งแต่ 10-250 สาย มีความยาวประมาณ 1-9 ไมครอน มีหน่วยย่อยกลูโคสประมาณ 2,000-18,000 หน่วย microfibril อยู่ในลักษณะเป็นสายยาวเรียงขนานกัน แต่ละสายจะเชื่อมด้วยพันธะไฮโดรเจน รวมอยู่กันเป็นมัดมีลักษณะเป็นเส้นใยเล็กๆ เรียกว่า cellulose fibril และเมื่อใช้เครื่อง transmission electron microscope ตรวจสอบเส้นใยเซลลูโลส (cellulose fibril) พบว่า มีขนาดความกว้างประมาณ 100 นาโนเมตร และหนาประมาณ 3-8 นาโนเมตร มีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของพืชชั้นสูง และเส้นใยสังเคราะห์ประมาณ 10-1,000 เท่าและ 100 เท่า ตามลำดับ (Yoshinaga et al., 1997) (รูปที่ 2) สมบัติของแผ่นวุ้นเซลลูโลสจาก *A. xylinum* ได้แก่

1. ไม่มีเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) และ เพคติน (pectin) เจือปน ทำให้ง่ายต่อการนำไปทำให้บริสุทธิ์ ส่วนปริมาณเซลลูโลสของแผ่นวุ้นจาก *Acetobacter xylinum* มีปริมาณเท่ากับ 1.10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเปียก ซึ่งมากกว่าปริมาณเซลลูโลสในสับประรด มะละกอ เนื้อมันเทศ และมะม่วง โดยมีปริมาณเซลลูโลสเท่ากับ 0.37 0.72 0.76 และ 0.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Lund and Smoot, 1982) และองค์ประกอบของแผ่นวุ้นเซลลูโลสดังแสดงในตารางที่ 1

2. มีความเป็น hydrophilic สูงเนื่องจากการมีพื้นที่ในโครงสร้างมากจึงสามารถอุ้มน้ำ (water holding capacity) สูงถึง 60-700 เท่าของน้ำหนักแห้ง (White and Brown, 1989)

3. ทนต่อแรงดึงได้สูงกว่าไฟเบอร์สังเคราะห์ต่างๆ โดยมีค่า Young's modulus ประมาณ 30,000 เมกกะปาสคาล ซึ่งสูงกว่า organic fiber ถึง 4 เท่า และค่าความต้านทานแรงดึง ซึ่งมีค่าสูงกว่าฟิล์ม polyethylene หรือ vinyl chloride ถึง 5 เท่า



รูปที่ 2 การเปรียบเทียบลักษณะเส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรียกับเส้นใยในพืชชั้นสูง โดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope A : เซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* B : เซลลูโลสจากพืช

ที่มา : Yoshinaga et.al. (1997)

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของแผ่นวุ้นเซลล์ลูโลสจาก *Acetobacter xylinum*

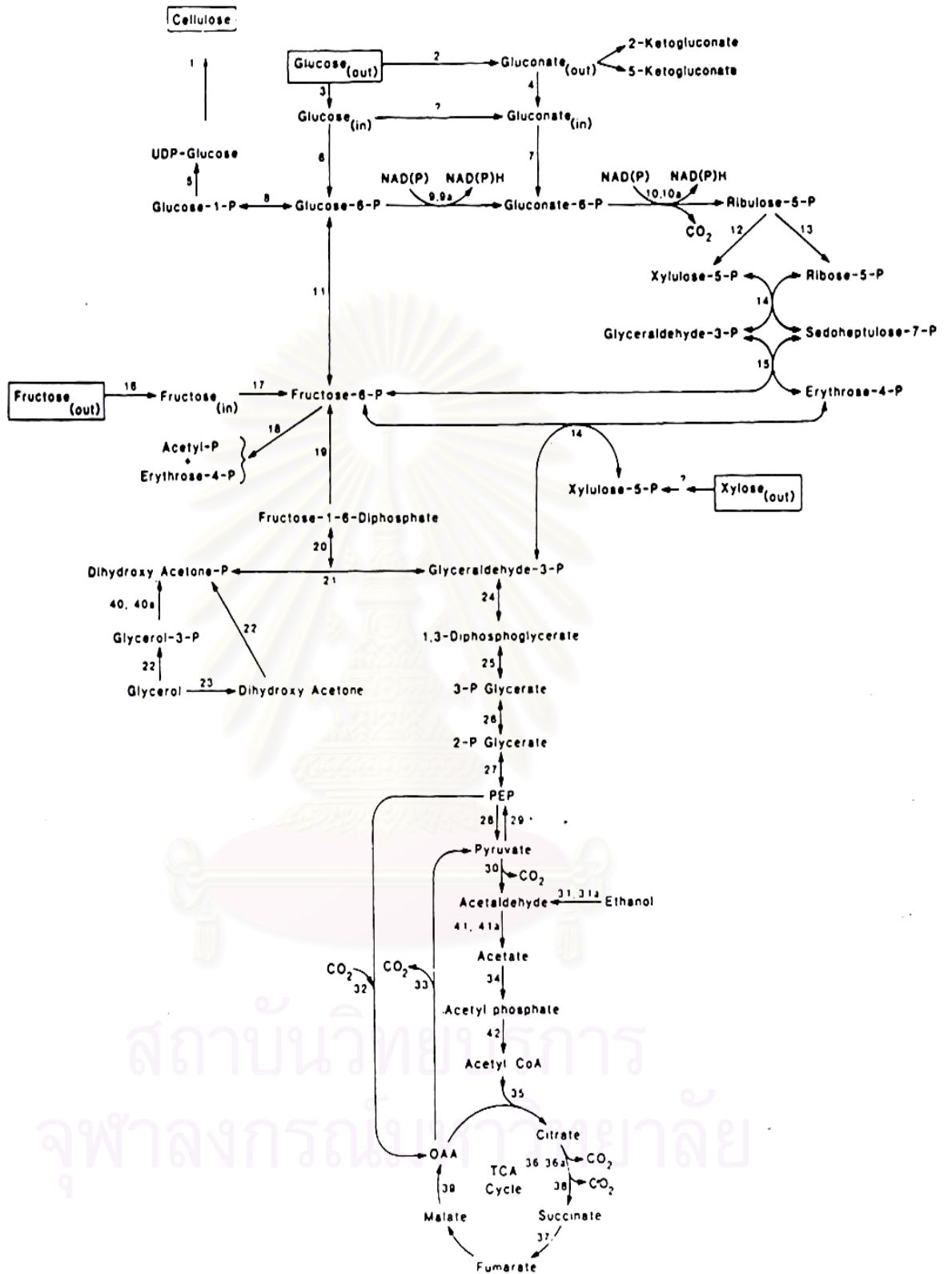
ส่วนประกอบ	ผลการวิเคราะห์โดย			
	Araceli (1962)	กรมวิทยาศาสตร์ บริการ (2518)	กองเกษตรเคมี (2529)	หน่วย
น้ำ	67.7	94.4	94.6	เปอร์เซ็นต์
ไขมัน	0.2	0.05	0.06	เปอร์เซ็นต์
ไฟเบอร์	-	1.10	1.15	เปอร์เซ็นต์
โปรตีน	nil	0.68	0.84	เปอร์เซ็นต์
เถ้า	-	0.77	0.10	เปอร์เซ็นต์
คาร์โบไฮเดรต	-	3.00	3.20	เปอร์เซ็นต์
แคลเซียม	12	34.5	5.20	มก./100กรัม
เหล็ก	5	0.20	-	มก./100กรัม
ฟอสฟอรัส	2	22.0	5.70	มก./100กรัม
วิตามินบี 1	trace	0.01	-	มก./100กรัม
วิตามินบี 2	0.01	0.02	-	มก./100กรัม
ไนอาซีน	-	0.22	0.22	มก./100กรัม

ที่มา : สมคิด ธรรมรัตน์ (2531)

2.3 การสังเคราะห์เซลล์ลูโลสของ *A. xylinum*

กลไกการสังเคราะห์เซลล์ลูโลสของ *A. xylinum* ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนที่สำคัญ ได้แก่

2.3.1. การสังเคราะห์ sugar nucleotide precursor *Acetobacter xylinum* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตเซลล์ลูโลสได้หลายชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส ไซโลส อะราบิโนส ซูโครส สตาร์ช กลีเซอรอล และ ดี-กลูโคโนแลคโตน เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่สามารถเข้าสู่วิถีเมตาบอลิซึมหลัก ได้แก่ pentose phosphate pathway สำหรับสารตั้งต้นที่เป็นคาร์โบไฮเดรต และ tricarboxylic acid cycle (TCA) สำหรับกรดอินทรีย์และอนุพันธ์ของกรดอินทรีย์ (รูปที่ 3)



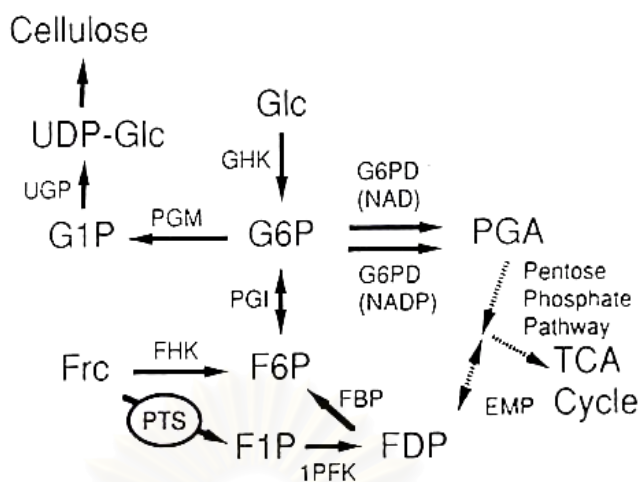
รูปที่ 3 วิธีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ และสารอนุพันธ์ของกรดอินทรีย์
 ที่มา : Ross et.al. (1991)

เมื่อสารที่ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนผ่านวิถีเมตาบอลิซึมหลักแล้วจะเกิดสาร uridine diphosphate glucose (UDP-G) หรือ sugar nucleotide precursor ซึ่งจะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์เซลลูโลส

จากรูปที่ 4 glucose จะถูกเปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate (G6P) โดยเอนไซม์ glucose hexokinase (GHK) จากนั้นจะเริ่มกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสโดย G6P จะถูกเปลี่ยนเป็น glucose-1-phosphate (G1P) โดยเอนไซม์ phosphoglucomutase (PGM) และ G1P จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น uridine diphosphate glucose (UDP-G) โดยเอนไซม์ glucose pyrophosphorylase (UGP) จากนั้น UDP-G จะถูกนำมาต่อกันเป็นสายของเซลลูโลส หรือ β -1,4-glucan chain โดยการทำงานของเอนไซม์ cellulose synthase บน plasma membrane ของ *Acetobacter xylinum*

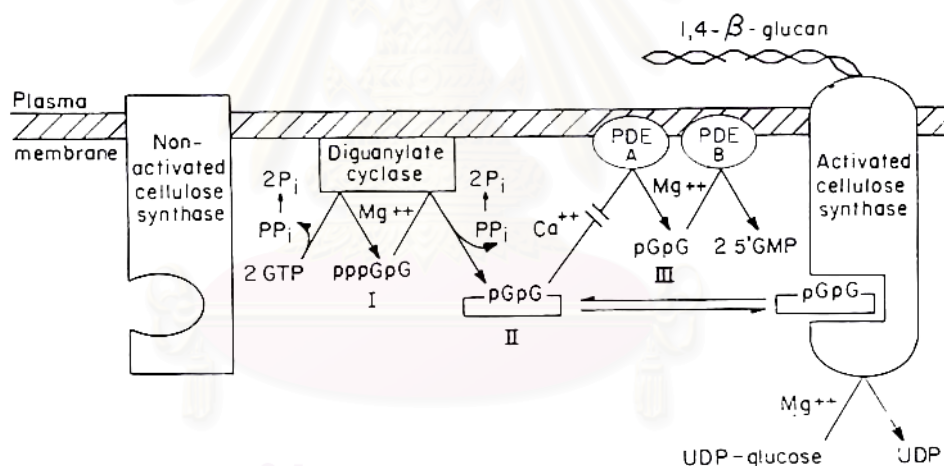
2.3.2. การสังเคราะห์เซลลูโลสโดยเอนไซม์ cellulose synthase การสังเคราะห์เซลลูโลสเริ่มจากเอนไซม์ diguanylate cyclase เปลี่ยน guanosine triphosphate (GTP) 2 โมเลกุล ให้เป็น diguanosine tetraphosphate (pppGpG) ซึ่งเป็น dinucleotide tetraphosphate โดยมีการปล่อย diphosphate (ppi) จากนั้นจึงเปลี่ยน pppGpG ให้เป็น diguanosine diphosphate (pGpG) โดยมีการปล่อย ppi เช่นเดียวกัน แล้วจึงเปลี่ยน pGpG ไปในสองทิศทาง โดยทิศทางแรกเอนไซม์ phosphodiesterase-A (PDE-A) ตัดพันธะ phosphodiester bond ในโครงสร้าง pGpG ได้ pGpG สายตรงซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่ active จากนั้น pGpG จะถูกเปลี่ยนไปเป็น 5'-GMP โดยเอนไซม์ phosphodiesterase-B (PDE-B) ทิศทางที่สองจะเกิดขึ้นเมื่อมี Ca^{2+} ยิ่งยั้งการทำงานของเอนไซม์ PDE-A ทำให้ pGpG ถูกเปลี่ยนไปเป็นสาย β -1,4-glucan chain (รูปที่ 5) โดยเอนไซม์ cellulose synthase ซึ่งจะไปเร่งการปลดปล่อยโมเลกุลของ glucose โมเลกุลของ glucose ที่ปลดปล่อยจะรวมตัวอยู่ในสารละลายดังแสดงในสมการ





รูปที่ 4 วิธีชีวเคมีของการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*

ที่มา : Yoshinaga et.al. (1997)

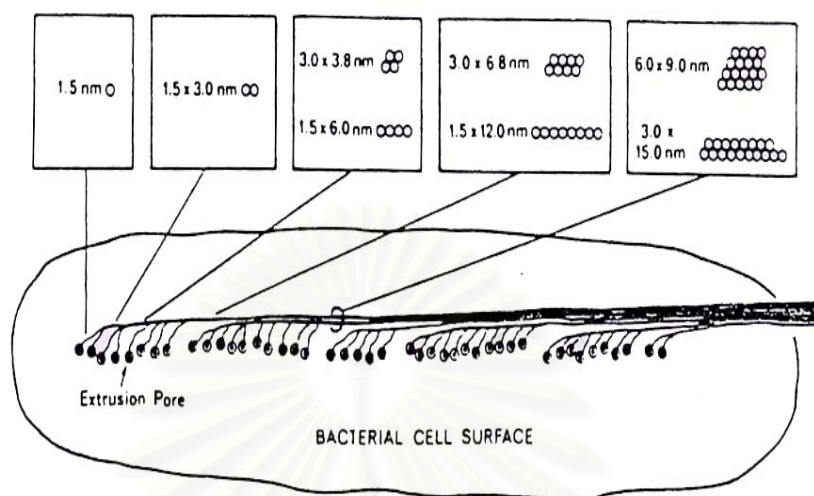


รูปที่ 5 กลไกการสังเคราะห์เซลลูโลสโดย cellulose synthase

ที่มา : Ross et.al (1991)

2.3.3. การรวมตัวของเส้นใยเซลลูโลส เซลลูโลสที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะถูกขับออกมาออกเซลล์ผ่าน extrusion pore ซึ่งเรียงตัวตามแนวยาวของเซลล์ โดยแต่ละสายของเซลลูโลสประกอบด้วย เส้นใยขนาดเล็ก เรียกว่า submicrofibril มีขนาด 1.5 นาโนเมตร จากนั้น submicrofibril จะรวมตัวกันมีลักษณะเป็นเกลียวเวียนซ้าย และรวมตัวกันเป็นสาย microfibril มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 นาโนเมตร ขนาดของ microfibril จะขึ้นอยู่กับขนาดของ

microcrystalline ของ microfibril แล้วแต่ละสายของ microfibril จะมัดรวมตัวกันเป็นเกลียว (ribbon) ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 การรวมตัวของเส้นใยเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum*
ที่มา : Ross et.al. (1991)

2.4 การนำเซลลูโลสจาก *A. xylinum* ไปใช้ประโยชน์

ได้มีการนำเซลลูโลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อาจจำแนกได้ดังนี้

2.4.1. การนำเซลลูโลสจาก *A. xylinum* ไปผสมกับโพลิเมอร์อื่นๆ เช่น polyvinyl alcohol เพื่อผลิตวัสดุที่มีความแข็งแรง และทนทาน ใช้เป็นสารให้ความหนืด และความคงตัวในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ในการนำเซลลูโลสมาทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อให้ได้ cellulose derivatives เช่น hydroxymethylcellulose , carboxymethylcellulose และ cellulose acetate จะทำให้การใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* ได้กว้างขวางขึ้น (White and Brown,1989 ; Ross et al., 1991 ; Lucca and Tepper,1994 ; Coffey et al.,1995)

2.4.2 ฟีนอลเรซิน (phenol resin) หรือเส้นใยคาร์บอน (carbon fiber) ซึ่งปกติไม่สามารถทำเป็นแผ่นได้ แต่เมื่อนำเซลลูโลสจาก *A. xylinum* ที่ผ่านการอบแห้งและบดเป็นผงแล้วมาผสมเพื่อเป็นตัวเชื่อม (binder) จะทำให้เส้นใยเหล่านี้ขึ้นรูปเป็นแผ่นได้

2.4.3. ในการผลิตกระดาษคาร์บอน (activated carbon fiber sheets) เพื่อใช้ในการดูดซับสารพิษ การเติมเซลลูโลสจาก *A. xylinum* ลงไปช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษให้ดีขึ้น

2.4.4. วัสดุที่ใช้ในการผลิตกระดาษลำโพงจำเป็นต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ ต้องให้คลื่นเสียงความเร็วสูง (high sonic velocity) และต้องลดคลื่นรบกวนได้ดี เพื่อให้ได้คุณภาพเสียงที่ชัดเจน วัสดุที่ใช้ในการผลิตกระดาษลำโพงมีหลายชนิด แต่ละชนิดจะมีข้อเสียแตกต่างกันออกไป บางชนิดมีข้อเสียที่มีสมบัติการลดเสียงรบกวนได้ไม่ดี ในขณะที่บางชนิดให้ความเร็วของคลื่นเสียงที่ต่ำเกินไป เช่นเพียง 1500 เมตรต่อวินาที แต่สำหรับการใช้เซลลูโลสจาก *A. xylinum* พบว่ามีข้อได้เปรียบ คือให้เสียงสูงที่ดี มีความเร็วของคลื่นเสียงสูงเท่ากับอะลูมิเนียม และยังมีสมบัติในการลดเสียงรบกวนได้ดีเท่ากระดาษคอนกรีต ดังนั้นเซลลูโลสจาก *A. xylinum* จึงสามารถนำมาผลิตกระดาษลำโพงได้ (White and Brown, 1989 ; Jonas and Farah, 1998)

2.4.5. ในทางการแพทย์ นำไปใช้ในการผลิตผิวหนังเทียม (artificial skin) หลอดเลือด (artificial arteries) (Ross et al., 1991 ; Brown, 2002) และ dialysis membrane (Shibasaki et al., 1993) เป็นต้น

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*

การเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* มีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง (สมคิด ธรรมรัตน์, 2530 ; วราวุฒิ ครูสง, 2539 ; Alaban, 1962) ได้แก่

2.5.1 สายพันธุ์ของ *Acetobacter* sp. และภาวะแปรผันของเชื้อ

การเลือกสายพันธุ์ของ *Acetobacter* sp. เพื่อนำมาผลิตเซลลูโลสมีหลักเกณฑ์ดังนี้ คือ เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสได้ในปริมาณที่สูง ในระยะเวลาอันสั้น ยืนที่ควบคุมการผลิตเซลลูโลสมีความเสถียร ให้ผลผลิตสม่ำเสมอ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด และราคาถูก ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมได้ดี และให้กรดอื่นที่ไม่ต้องการในปริมาณที่ต่ำ (Asai, 1968)

Toyosaki และคณะ (1995) คัดแยก *Acetobacter* sp. ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสในสภาวะเขย่า จากผลไม้ ถั่ว ดอกไม้ และจากดิน พบว่า *Acetobacter* sp. BPR 2001 คัดแยกจากผลไม้มีความสามารถในการผลิตเซลลูโลสได้ดีที่สุด Dudman (1960) ศึกษาการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter acetigenum* 2 สายพันธุ์ *A. xylinum* 6 สายพันธุ์ *A. kutzinjanum* 2 สายพันธุ์ และ *A. pasteurianum* 1 สายพันธุ์ พบว่า *A. xylinum*

supsp. HCCB-155 เหมาะสมสำหรับนำไปผลิตเซลลูโลส เนื่องจากมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลสได้สูง

ภาวะผันแปรของ *A. xylinum* เกิดเนื่องจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูโลสบนเอนไซม์เซลลูเลสซินเทส (cellulase synthase) บนไซโตพลาสซึมเมมเบรน คือ *acsAB* เปลี่ยนเป็น *acsAll* (Saxena et al., 2002) ส่งผลทำให้เชื้อมีพฤติกรรมการสร้างเซลลูโลสลดลง Saxena และ Brown (1988) พบว่าลักษณะทางกายภาพของโคโลนีของ *A. xylinum* ATCC 53582 เปลี่ยนแปลงจาก swollen colony เป็น smooth colony แสดงให้เห็นว่าเชื้อดังกล่าวเกิดภาวะผันแปรขึ้นโดยเซลลูโลสที่สร้างขึ้นโดย smooth colony อยู่ในรูป cellulose II (Robert et al., 1989) ต่างจากสภาวะปกติที่เซลลูโลสที่เชื้อสร้างขึ้นจะอยู่ในรูป cellulose I

นอกจากนี้สภาวะการหมักยังส่งผลต่อภาวะการแปรผันของเชื้อ Krystynowicz และคณะ (2002) ศึกษาภาวะการแปรผันของ *A. xylinum* E25 เนื่องจากสภาวะการหมักโดยศึกษาในสภาวะนิ่ง และเขย่า พบว่า สภาวะเขย่าส่งผลให้เชื้อเกิดภาวะ non-cellulose producing mutants (*Cel⁻* mutants) คือเชื้อมีพฤติกรรมการสร้างเซลลูโลสลดลง การที่เกิดพฤติกรรมแบบนี้เป็นผลมาจากยีนบนเอนไซม์เซลลูเลสซินเทส เกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่ง ในขณะที่การหมักแบบสภาวะนิ่งส่งผลให้เชื้อมีพฤติกรรมคงเดิม (*Cel⁺* mutants)

2.5.2 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณเชื้อที่ใช้ต้องมีมากพอ เพื่อให้เชื้อเจริญได้อย่างรวดเร็วจนมีปริมาณมากกว่าเชื้อชนิดอื่นที่อาจติดมากับน้ำมะพร้าว หรืออาจปนเปื้อนระหว่างหมัก ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมที่ใช้ในการหมักอยู่ในช่วงร้อยละ 10-20 เปอร์เซ็นต์ (วรารุณี ครุสง, 2536) และใช้เชื้อที่มีอายุ 3 วัน จะทำให้ผลผลิตดีที่สุด เมื่อเชื้อเจริญและมีปริมาณมากพอจนถึงระดับหนึ่งเชื้อจะสร้างเซลลูโลส ส่วนการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในปริมาณมาก มีผลทำให้การผลิตเซลลูโลสของเชื้อลดลง Alaban (1962) รายงานว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด แต่ถ้าใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นมากกว่านี้ พบว่า จำนวนเซลล์แบคทีเรียจะแน่นหนาเกินไป ทำให้เกิดภาวะแข่งขัน จนมีการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสลดลง

2.5.3 สารอาหารคาร์บอน (carbon source)

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสโดยเป็นแหล่งพลังงานของเชื้อ และองค์ประกอบหลักของสายเซลลูโลสโดยเชื้อสามารถใช้คาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แหล่งคาร์บอนสำหรับ *A. xylinum*

Carbon source		Cellulose yield (relative%)
Monossacharides	D-fructose	92
	D-galactose	15
	D-glucose	100
	D-xylose	11
	D-arabinose	14
	L-sorbose	11
Disaccharides	Lactose	16
	Maltose	7
	Sucrose	33
Polysaccharides	Starch	18
Alcohol	Ethanol	4
	Ethylene glycol	1
	Diethylene glycol	1
	Propylene glycol	8
	Glycerol	93
Organic acids	Myo-inositol	17
	Citric acid	20
	L-malic acid	15
Other	Succinic acid	12
	D-glucono lactone	62

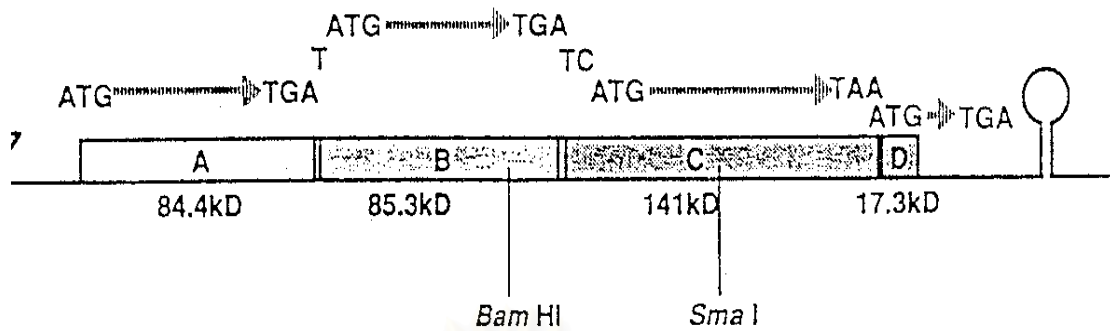
ที่มา : Masaoka et.al. (1993)

Alaban (1962) ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลล์ของ *Acetobacter* sp. ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ซูโครส กาแลคโตส แมนนิทอล มอลโตส แลคโตส และอราบิโทส พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และกลีเซอรอล ให้ผลผลิตเซลล์สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ

ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนก็มีผลเช่นกัน Masaoka และคณะ (1993) แปรชนิดของแหล่งคาร์บอนพบว่า กลูโคส ฟรุคโตส และกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม และพบว่า เซลล์จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส Oikawa และคณะ (1995) เลี้ยง *Acetobacter xylinum* KU-1 ในอาหารที่ใช้แมนนิทอลและอราบิโทลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้แมนนิทอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เพื่อให้ผลผลิตเซลล์มากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 3 เท่า และการใช้อราบิโทลร้อยละ 1.5 เพื่อให้ผลผลิตเซลล์มากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 6 เท่า

2.5.4 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)

เซลล์แบคทีเรียมีองค์ประกอบของไนโตรเจนประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ความต้องการไนโตรเจนของแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น พีเอช อุณหภูมิ และออกซิเจน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมไนโตรเจนอยู่เลยจะทำให้ *Acetobacter xylinum* ไม่สามารถเจริญและสร้างเซลล์ได้ การเติมสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยเฉพาะสารที่อยู่ในรูปของแอมโมเนีย จะช่วยเร่งการเจริญเติบโตและการสร้างเซลล์ให้เร็วขึ้น โดยสารประกอบไนโตรเจนเกี่ยวข้องกับ nitrogenous regular gene (White, 1995) บนเอนไซม์เซลลูเลส ซินเทส (cellulase synthase) บนไซโตพลาสซึมเมมเบรน ได้แก่ *acsAB acsB acsD* (Valla, 1995 ; Saxena et al., 2002) (รูปที่ 7) จากการศึกษาพบว่า การใช้แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) ร้อยละ 0.5 เชื้อสามารถผลิตเซลล์ได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับไนโตรเจนจากแหล่งอื่นๆ ได้แก่ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , NaNO_3 , peptone, yeast extract และ corn steep liquor เป็นต้น

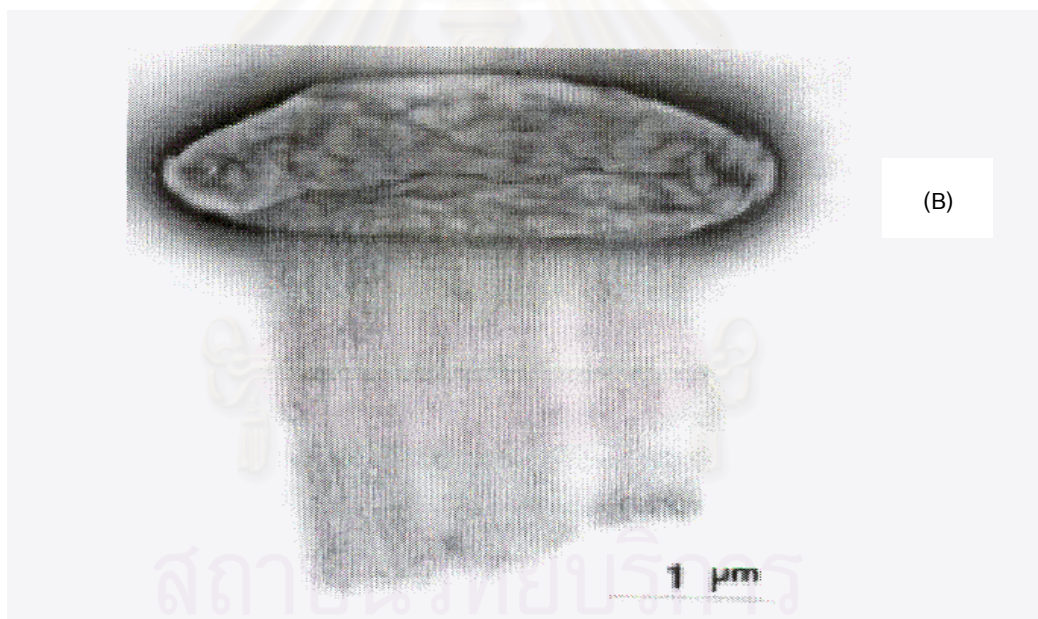
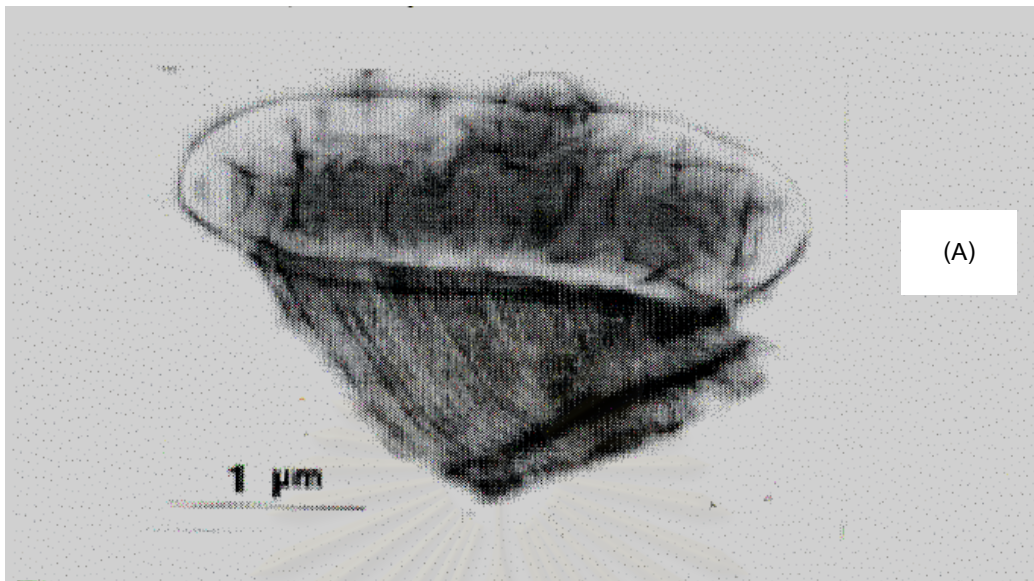


รูปที่ 7 ยีนควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลสบนไซโตพลาสซึมเมมเบรน
ที่มา : Valla (1995)

2.5.5 อุณหภูมิ

A. xylinum สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 28-32 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้มากๆ เชื้ออาจเจริญได้ แต่ไม่สร้างเซลลูโลส เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อสมบัติของเอนไซม์และการเสถียรภาพของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของเชื้อ Alaban (1962) และ Lapuz et al. (1967) รายงานสอดคล้องกันว่าในการเลี้ยง *Acetobacter* sp. ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิในช่วง 10-45 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อเจริญเติบโตได้ แต่ไม่สร้างเซลลูโลส การสร้างเซลลูโลสเชื้อจะเริ่มสร้างที่อุณหภูมิเท่ากับ 20 องศาเซลเซียส นอกจากนี้อุณหภูมียังส่งผลต่อพฤติกรรมการสร้างเส้นใยเซลลูโลสของเชื้อโดย Hirai และ Horii (1999) ศึกษาพบว่าการเลี้ยง *A. xylinum* ในอาหาร Hestrin & Schramm ที่ 4 องศาเซลเซียส เชื้อไม่สามารถสร้างเส้นใยเซลลูโลสเป็นเกลียว (ribbon) แต่จะสร้างเส้นใยเซลลูโลสที่มีลักษณะ Dense และ Coarse (รูปที่ 8)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 ลักษณะการพันของเส้นใยเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*

A : แบบ Dense B : แบบ Coarse

ที่มา : Hirai and Horii (1999)

2.5.6 ออกซิเจน และอัตราการให้อากาศ

ออกซิเจนที่เข้าร่วมในกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์แบคทีเรียจะอยู่ในรูปของโมเลกุลของออกซิเจนที่ละลายได้ (dissolved oxygen molecule : DO) ออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับ กลูโคส แต่ที่ออกซิเจนแตกต่างจากสารอาหารอื่นคือ การละลายของออกซิเจนในน้ำมีปริมาณจำกัด โดยละลายได้น้อยกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการส่งผ่านออกซิเจนจากฟองอากาศเข้าสู่เซลล์มี 3 ขั้นตอนดังนี้ (Stanbury et al. ,1995)

1. การส่งผ่านออกซิเจนจากฟองอากาศให้ละลายเข้าไปในอาหารเหลว
2. การส่งผ่านออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลวไปยังเซลล์จุลินทรีย์
3. การดูดซึมออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์

A. xylinum เป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ดังนั้นปริมาณออกซิเจนเกี่ยวข้องกับ การเจริญและสร้างเซลลูโลส ออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการสังเคราะห์พลังงาน ซึ่งถูกกระตุ้นโดย cytochrome oxidase ในกระบวนการหายใจทั่วไปการผลิตเซลลูโลสจะเป็นแบบภาวะนิ่ง (static culture) ในการหมักเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญได้เร็วและสร้างแผ่นเซลลูโลสได้ดีจะต้องหมักในภาชนะที่มีผิวหน้ากว้าง เพื่อให้มีการซึมผ่านของออกซิเจน จุลินทรีย์จึงลอยตัวอยู่ที่ผิวหน้าของอาหารที่นิ่ง และเมื่อเชื้อมีจำนวนและระดับความหนาแน่นในระดับหนึ่งเชื้อจะเริ่มสร้างเซลลูโลส

Ebner (1997) พบว่า *Acetobacter* sp. จะมีเอนไซม์อะไพเรส (apayrase) ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพลังงาน ATP (ซึ่งเป็นแหล่งพลังงาน และมีการสะสมในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก) ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เหลือพลังงาน ATP สำหรับการสร้างสารเมตาโบไลต์ต่างๆ ของเซลล์ในระดับต่ำ ดังนั้นเมื่อลดการให้อากาศทำให้พลังงาน ATP ในแหล่งเก็บพลังงาน หรือ ATP pool สูญเสียไปอย่างรวดเร็ว ส่งผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์

Guzman และคณะ (1982) รายงานว่าปริมาณอากาศมีความสำคัญต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *A. xylinum* โดยศึกษากระบวนการผลิต 2 แบบ คือตั้งทิ้งไว้ (static culture) กับ สภาวะที่มีการให้อากาศและการกวนในถังหมักขนาด 1.0 ลิตร อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.25 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้

เท่ากับ 22.47 และ 71.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้การให้ออกซิเจนหรือออกซิเจนระหว่างการหมักที่เกินความจำเป็นของเชื้อจะส่งผลทำให้เกิดการสร้างกรดเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะกรดกลูโคนิก (Asai, 1968) ส่งผลให้การสร้างเซลล์ลดลง

Kouda และคณะ (1996) ศึกษาผลของก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในการผลิตเซลล์จาก *Acetobacter xylinum* BPR3001A ในถังหมัก พบว่าปริมาณผลผลิตเซลล์เพิ่มขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพการถ่ายโอนออกซิเจน การถ่ายโอนออกซิเจนจะลดลงเมื่อความหนืดของระบบเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณเซลล์ในระหว่างการผลิต สำหรับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในช่วงความดัน 0.15- 0.20 บรรยากาศ ส่งผลให้อัตราการผลิตเซลล์ในหน่วยกรัมต่อลิตรลดลง เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลไปยับยั้งการใช้ออกซิเจนของเชื้อ ส่งผลให้การสังเคราะห์พลังงาน ATP ลดลง

2.5.7 ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างเซลล์ อยู่ในช่วง 4-5 ค่าพีเอชจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ protoplasm ขึ้นมาใหม่จนกระทั่งแบ่งตัวออกเป็นเซลล์ใหม่ และเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์และอนุพันธ์ของกรดอินทรีย์ ในกระบวนการหมักจะใช้ acetic acid ปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Alaban (1962) รายงานว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ 4-5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเซลล์ของ *A. xylinum* เมื่ออาหารมีค่าพีเอช 3 การเจริญของเชื้อจะลดลง และค่าพีเอชมากกว่า 8 เชื้อไม่สามารถเจริญได้

Daimaguila (1967) รายงานว่ากรดอะซิติกที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลโดยตรงต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์โปรตีนและการแบ่งเซลล์ของ *A. xylinum* เชื้อยังใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Naritomi et al., 1998) และป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรียอื่นที่ไม่สามารถทนกรดได้อีกด้วย (Masaoka et al., 1993)

สมศรี ลีปีพัฒนวิทย์ (2531) ศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญของ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 86 โดยแปรค่าพีเอชในช่วง 3-5 พบว่า พีเอชเท่ากับ 4.5 ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด นอกจากนี้พีเอชยังส่งผลต่อการเกิดออกซิเดชันของกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิกในระบบการหมัก Hwang และคณะ (1999) แปรค่าพีเอชในการเลี้ยง *Acetobacter xylinum* BRC5 เป็น 4 5 และ 6 พบว่าพีเอช 4 เหมาะสมต่อการเกิดออกซิเดชันของกลูโคสมากที่สุด โดยมีค่า GOD activity เท่ากับ 1 ในขณะที่พีเอช 5 และ 6 มีค่า เท่ากับ 0.57 และ 0.30 ตามลำดับ ปฏิกริยาดังกล่าวเกิดขึ้นบริเวณ outer surface ของ cytoplasmic membrane (Matsushita et al., 1994)

2.5.8 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter xylinum* คือ น้ำมะพร้าวแก่ (วราวุฒิ ครูสง และคณะ, 2535 ; สมศรี ลีปีพัฒนวิทย์, 2531) เนื่องจากเป็นวัตถุดิบเหลือใช้ และมีสารอาหารเหมาะสมสำหรับการเจริญและสร้างเซลลูโลสของเชื้อ องค์ประกอบของน้ำมะพร้าวจะแตกต่างกันไปตาม อายุ พันธุ์ และแหล่งเพาะปลูก น้ำมะพร้าวที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อควรเป็นน้ำมะพร้าวสดไม่เน่าเสีย นำมาต้มเพื่อให้ไขมันละลายและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมา การเจือจางน้ำมะพร้าวก่อนจะทำให้ผลผลิตเซลลูโลสลดลง นอกจากนี้สามารถใช้ น้ำสับประรด น้ำอ้อย หางนม (วราวุฒิ ครูสง และคณะ, 2536) หรือน้ำผลไม้มาใช้เป็นวัตถุดิบได้เช่นกัน

2.5.9 สารส่งเสริมการสร้างเซลลูโลส

Ishikawa และคณะ (1998) รายงานว่าการเติม p-aminobenzoic acid ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้ *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans* BPR3001E ผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 40 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากสารดังกล่าวไปกระตุ้นการสร้างสารประกอบ adenosine related purine ในเซลล์ ได้แก่ AMP ADP และ ATP สารประกอบดังกล่าวเกี่ยวข้องกับ fructose phosphorylation

ในขณะที่ Tonouchi Tahara และคณะ (1995) รายงานว่าการใช้ endoglucanase ทั้งในรูปแบบ Meicelase P-1 เป็นเอ็นไซม์ผสมระหว่าง endoglucanase exocellobioglucosidase และ β -glucosidase และ endoglucanase บริสุทธิ์ที่สกัดได้จาก *Bacillus* sp. ความเข้มข้น 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans* BPR2001 ผลิต

เซลลูโลสได้สูงสุด และในปี 1998 Tonouchi Horinouchi และคณะ รายงานว่าการนำยีนที่สังเคราะห์ sucrose phosphorylase (SPase) เป็นเอ็นไซม์ที่สามารถคะตะไลส์ น้ำตาลซูโครส ไปเป็น glucose-1-phosphate และ ฟรุกโตส จาก *Leuconostoc mesenteroids* มาใส่ใน *Acetobacter* strain G7 เชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้นจาก 5.06 เป็น 6.44 กรัมต่อลิตร

2.6 การหมักเพื่อผลิตเซลลูโลสด้วย *Acetobacter xylinum*

Nata de coco หรือที่รู้จักกันในชื่อ วุ้นน้ำมะพร้าว หรือวุ้นเซลลูโลส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักของ *Acetobacter xylinum* สามารถทำการหมักได้ในสภาวะการหมักดังนี้

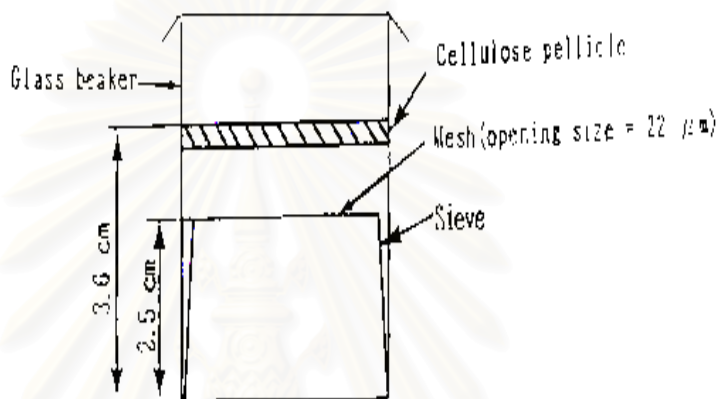
2.6.1 การหมักแบบสภาวะนิ่ง (static culture)

กระบวนการผลิตโดยทั่วไปใช้น้ำมะพร้าว ซึ่งเป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้คือ มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยใช้น้ำตาลซูโครส 5-10 เปอร์เซ็นต์ ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 4-5 ธาตุอาหารอื่นๆที่เติม เช่น ไคแอมโมเนียมฟอสเฟตหรือแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปต้มฆ่าเชื้อ เมื่ออาหารเย็นถ่ายลงภาชนะที่มีขอบสูง กลุ่มด้วยผ้าขาวบาง ห้องบ่มต้องมีการสุกอากาศที่ดี ฆ่าเชื้อห้องบ่มก่อนการหมักทุกครั้ง จากนั้นใส่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10-40 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-14 วัน (วราวุฒิ ครุสง และคณะ, 2535) จนได้แผ่นเซลลูโลสบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะขาวครีมมีเนื้อสัมผัสเหนียวแน่น กระบวนการผลิตดังกล่าวเรียกว่า การหมักแบบสภาวะนิ่ง (static culture) ใช้เวลาในการผลิตนาน มีของเหลือทิ้งจากการหมักสูง ใช้พื้นที่มาก และควบคุมสภาพปลอดเชื้อได้ยาก

Dudman (1960) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* สายพันธุ์ต่างๆในสภาวะผิวนิ่งกับสภาวะเขย่า พบว่าการผลิตเซลลูโลสในสภาวะผิวนิ่ง มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ และผลผลิตเซลลูโลส (cellulose yield) เกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำกว่าการผลิตในสภาวะเขย่า เนื่องจากระยะเวลาในการผลิตนานกว่า แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศโดยการเขย่า พบว่า ผลผลิตเซลลูโลสลดลง ซึ่งทำการแก้ไขโดยการเติม neutralizing agent และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิต

เซลลูโลสของการหมักทั้งสองแบบ พบว่าการหมักในถังหมักได้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

Masaoka และคณะ (1993) ศึกษาตำแหน่งหรือบริเวณที่ *Acetobacter xylinum* จะทำการสร้างวุ้นเซลลูโลสในสภาวะนิ่ง พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาชนะแก้วโดยมีตะแกรงลวดบรรจุอยู่ภายในโดยอยู่ในตำแหน่งที่ต่ำกว่าผิวหน้าอาหาร อยู่เหนือก้นภาชนะ 2.5 เซนติเมตร (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 ตำแหน่งตะแกรงลวดสำหรับศึกษาบริเวณที่ *A. xylinum* จะสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลส

ที่มา : Masaoka et.al. (1993)

โดยตะแกรงลวดจะทำหน้าที่แบ่งส่วนพื้นของการหมักออกเป็นตำแหน่งใกล้ผิวหน้าอาหาร และไกลออกไป จากการศึกษพบว่า เชื้อจะสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสเฉพาะที่บริเวณผิวหน้าเท่านั้น แสดงว่าที่บริเวณผิวหน้ามีอากาศหรือออกซิเจนมากกว่าตำแหน่งด้านล่าง และเมื่อศึกษาขนาดพื้นที่ผิวที่สัมผัสกับอากาศ ปริมาตร และความสูงอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตวุ้นเซลลูโลส พบว่า อัตราการผลิตวุ้นเซลลูโลสจะเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดพื้นที่ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อที่สัมผัสกับอากาศเพิ่มขึ้น ส่วนการเพิ่มปริมาตร และความสูงอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ทำให้การผลิตวุ้นเซลลูโลสเพิ่มขึ้น จากผลการทดลองจะเห็นว่าขนาดพื้นที่ผิวที่สัมผัสกับอากาศมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเซลลูโลส แสดงว่าอากาศหรือปริมาณออกซิเจนส่งผลต่อการผลิตวุ้นเซลลูโลสของ *A. xylinum* ผลการทดลองสนับสนุนการศึกษาของ Budniono และคณะ (1999) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการหมักแบบภาชนะนิ่งเป็นวิธีที่จำกัดปริมาณออกซิเจนของระบบการหมัก จากข้อจำกัดดังกล่าวจึงมีผู้ศึกษาผลของการแทรกผ่านออกซิเจน และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการหมักโดยใช้เครื่องหมัก (fermenter) เพื่อใช้เป็นข้อมูล

ในการเพิ่มผลผลิตขุ่นเซลลูโลสให้เพียงพอสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในระดับอุตสาหกรรม และลดปัญหาดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

Watanabe และ Yamanaka (1995) ศึกษาผลของออกซิเจนต่ออัตราการผลิตและลักษณะทางกายภาพของเซลลูโลสจาก *A. xylinum* สายพันธุ์ต่างๆ ภายใต้สภาวะผิวนิ่งในถังหมัก พบว่า อัตราการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปริมาณออกซิเจนที่ผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ (oxygen tension) มีค่าเท่ากับ 10-15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเมื่อเพิ่ม oxygen tension ให้อยู่ในช่วง 15-30 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเจริญของเซลล์คงที่ และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของเซลลูโลสโดยใช้ scanning electron microscopy (SEM) พบว่า ความหนาแน่นของเส้นใยที่สภาวะ oxygen tension เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์มีมากที่สุด และความหนาของแผ่นเซลลูโลสจะลดลงเมื่อ oxygen tension เพิ่มขึ้น

2.6.2 การหมักแบบสภาวะเขย่า และแบบมีการให้อากาศโดยใช้เครื่องหมัก

Naritomi และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสในถังหมักแบบต่อเนื่องโดยเลี้ยง *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR3011A ในอาหาร Fructose Corn Steep Liquor (Fru-CSL) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตส 30 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนที่ละลาย (dissolved oxygen) 10 เปอร์เซ็นต์ ค่าพีเอช 5.0 และ อัตราการเติมอาหารในถังหมักที่อัตราการเจือจางระหว่าง 0.03-0.10 ต่อชั่วโมง พบว่าอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.07 ต่อชั่วโมง ให้อัตราการผลิตเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่เมื่ออัตราการเจือจางและความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสเพิ่มขึ้น ทำให้ผลผลิตเซลลูโลสลดลง เมื่อเติมแลคเตทในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 12.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.1 ต่อชั่วโมง การเจริญของเซลล์และการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ที่อัตราการผลิต 0.90 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 36 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปลี่ยนจากแลคเตทมาเป็นเอทานอลปริมาณ 10.0 กรัมต่อลิตร พบว่า การเจริญของเซลล์และการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้นในอัตราการผลิต 0.95 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 46 เปอร์เซ็นต์ (Naritomi et al., 1998)

Chao และคณะ (2000) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสใน 50 L Internal -loop airlift reactor โดยใช้ *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR2001 พบว่า อัตราการผลิตเซลลูโลสในถังหมักแบบ airlift มีค่าเท่ากับ 0.0567 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าการผลิตเซลลูโลสโดยใช้ agitated-stirred tank fermenter และเมื่อมีการเติมออกซิเจนในอากาศที่ให้แก่

ถังหมัก 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอากาศที่ให้แก่ระบบ พบว่า อัตราการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า แต่ลักษณะเซลลูโลสที่ได้แตกต่างจาก fibrous form คือ มีลักษณะเป็น pellet ซึ่งให้ลักษณะการถ่ายโอนออกซิเจนที่ดีกว่า

Kouda และคณะ (1997) ศึกษาผลของความดันของก๊าซออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของ *A. xylinum* subsp. *sucofermentans* BPR3001A ในถังหมัก พบว่า อัตราการผลิตเซลลูโลสจะขึ้นอยู่กับอัตราการส่งผ่านออกซิเจน เมื่อการผลิตเซลลูโลสของเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ การส่งผ่านออกซิเจนของการหมักจะลดลง เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดเพิ่มขึ้น ส่วนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลทำให้การผลิตเซลลูโลสของเชื้อลดลง

2.6.3 การหมักแบบ Horizontal rotating ในงานเทคโนโลยีชีวภาพ

Reu และคณะ (1995) ศึกษาการเจริญของ *Rhizopus oligosporus* ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน (rotating drum fermenter) พบว่า เมื่อใช้ความเร็วในการหมุนถังหมักทรงกระบอกเท่ากับ 30 รอบต่อนาทีมีผลทำให้เชื้อมี activity สูงสุด

Tanaka และคณะ (1983) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ฟัซในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน (rotating drum fermenter) พบว่า ความเร็วรอบในการหมุนถังหมักทรงกระบอกและความหนืดมีผลต่อการส่งผ่านออกซิเจนในถังหมัก โดยเมื่อความเร็วในการหมุนเท่ากับ 75 รอบต่อนาที ให้ค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจน (oxygen transfer coefficient, $K_L a$) สูงที่สุด และเมื่อความหนืดของ medium เพิ่มขึ้นค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนจะลดลง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเซลล์ฟัซระหว่าง ถังหมักแบบกวนด้วยใบกวนแรงกล (mechanically agitated fermenter) กับ ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนใน ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน และค่า cell mass concentration มีค่าสูงกว่า และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ที่ความเร็วรอบ 115 รอบต่อนาที พบว่าใน ถังหมักแบบกวนด้วยใบกวนแรงกล มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่ต่ำกว่าเนื่องจากมีสภาวะของ hydrodynamic stress ที่สูงกว่า จากข้อดีของถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน (rotating drum fermenter) คือ มี hydrodynamic stress ต่ำและประสิทธิภาพการถ่ายโอนออกซิเจนที่สูง สามารถนำข้อได้เปรียบดังกล่าวมาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส

จาก *A. xylinum* เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ ซึ่งสภาวะผิวนิ่งและสภาวะเขย่าทำไม่ได้

สำหรับการใช้สภาวะการหมักแบบ Horizontal rotating เพื่อผลิตเซลลูโลสจาก *A. xylinum* มีงานวิจัยดังนี้

Krystynowics และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* E 25 โดยใช้ Horizontal rotating fermentor พบว่า การใช้ความเร็วรอบในการหมุนถึงหมักเท่ากับ 4 รอบต่อนาที ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด และสมบัติเซลลูโลสที่ได้ต่างจากเซลลูโลสจากสภาวะนิ่งโดยมีค่า young's modulus ต่ำกว่า และมีค่า water holding capacity สูงกว่า ผู้วิจัยยังพบอีกว่าพฤติกรรมการสร้างเซลลูโลสยึดเกาะติดแผ่น Disc ในถังหมักได้ มีผลดีต่อการหมัก คือ ทำให้เชื้อสามารถได้รับสารอาหารไปพร้อมกับการได้รับออกซิเจน หรืออากาศไปพร้อมๆ กัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Serafica และคณะ (2002)

Serafica และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* โดยใช้ rotating disk reactor พบว่า น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนถูกใช้เพิ่มขึ้นไปพร้อมกับการเพิ่มขึ้นผลผลิตเซลลูโลส และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตเซลลูโลสพบว่า ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าการหมักแบบสภาวะนิ่ง

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Acetobacter sp. สายพันธุ์ TISTR 975 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ผ่านการไลโอไฟไลซ์ ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก 1.1)

3.2 วัตถุประสงค์และสารเคมี

3.2.1 นำน้ำมะพร้าวแก่ สด มากกรอง ต้มให้เดือดและทิ้งไว้ให้เย็น ตักไขมันที่ลอยหน้าออก ปรับให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดเป็น 4 องศาบริกซ์ ด้วยน้ำต้มสุกหรือน้ำตาลทรายแห้งเย็นที่ -4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.2.2 แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Ammonium dihydrogenphosphate) AR Grade

3.2.3 แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate) AR Grade

3.2.3 กรดอะซิติก (Acetic acid) AR Grade

3.2.4 ผงวุ้น (Agar powder) Merck

3.2.5 กลูโคส (Glucose) AR Grade

3.2.6 ซูโครส (Sucrose) AR Grade

3.2.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) AR Grade

3.2.8 ฟีนอล (Phenol) AR Grade

3.2.9 กรดซัลฟูริก (Sulphuric acid) AR Grade

3.2.10 ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalene) AR Grade

3.2.11 เอทานอล (Ethanol) AR Grade

3.2.12 กรดกลูโคนิก (Gluconic acid) AR Grade

3.2.13 กรดบอริก (Boric acid) AR Grade

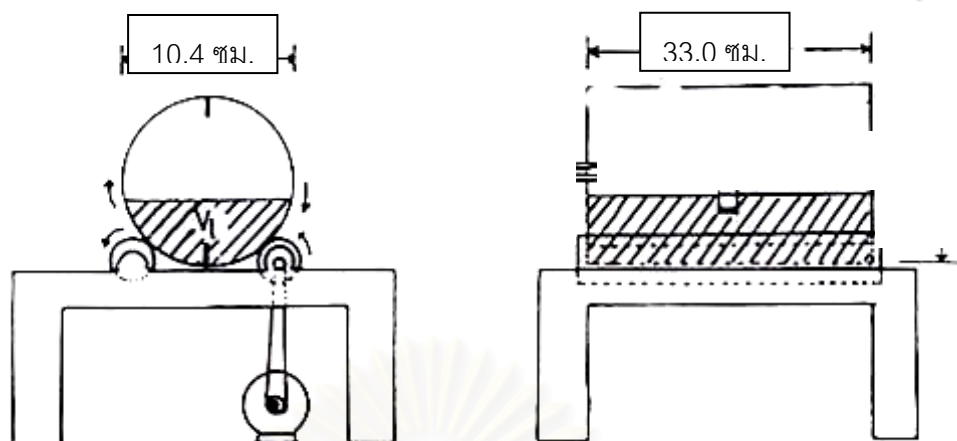
3.2.14 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) The East Asiatic (Thailand) Public Co.,Ltd.

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย

- 3.3.1 Hand refractometer
- 3.3.2 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) SCHOTT model CG 840
- 3.3.3 เครื่องชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง Sartorius
- 3.3.4 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
- 3.3.5 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) TOMY model SS-320 และ SANYO Labo
- 3.3.6 ตู้อบลมร้อน (อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส) WTB binder
- 3.3.7 ตู้อบลมร้อน (อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส) PROLABO
- 3.3.8 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) United Instrument Co.,LTD. และ Haraeus Instruments
- 3.3.9 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow cabinet) ISSCO model BVT-123
- 3.3.10 เครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) Hettich model EBA 12
- 3.3.11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Milton Roy model Spectronic G01
- 3.3.12 เครื่องวัดค่าการละลายออกซิเจน (Portable oxygen meter) WTW model oxi320
- 3.3.13 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning electron microscope) JSM-5310LV Scanning microscope , JEOL
- 3.3.14 HPLC
- 3.3.15 เครื่องวิเคราะห์โปรตีน Buchi 425 ประเทศเยอรมัน
- 3.3.16 เครื่องแยกเหวี่ยง (Centrifuge) Hettich model EBA 12

3.4 ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน (Rotating Drum Fermenter)

ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ประกอบด้วย ตัวถังทำจากท่อสเตนเลสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.4 เซนติเมตร ความยาวเท่ากับ 33 เซนติเมตร วางอยู่บนเพลาลม 2 ท่อ โดยเพลานึ่งสามารถหมุนได้อิสระ และอีกเพลานึ่งเป็นเพลาชับตอเข้ากับมอเตอร์ขนาด 0.75 kW ผ่านสายพานควบคุมความเร็วรอบในการหมุนถังหมักโดยอาศัย inverter ปรับกระแสไฟฟ้าที่เข้าสู่ตัว Motor โดยปรับความเร็วรอบในช่วง 0 – 15 รอบต่อนาที ดังรูปที่ 10 (ภาคผนวก จ)



รูปที่ 10 ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน (Rotating drum fermenter)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Tanaka et.al. (1983)

3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.5.1. การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (starter) และอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5.1.1 การเตรียมอาหารเหลวน้ำมะพร้าวสำหรับเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยง *Acetobacter* sp. TISTR 975 คือ อาหารแข็งน้ำมะพร้าว ประกอบด้วย น้ำมะพร้าวแก่ที่ผ่านการกรองต้มเดือด และแยกไขมันออก 1 ลิตร น้ำตาลทราย 5 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 1.5 เปอร์เซ็นต์ (อังคณา พันธุ์ศรี, 2541) ปรับความเป็นกรดต่าง ให้ได้เท่ากับ 4.75 และอาหารเหลวน้ำมะพร้าว มีสูตรอาหารเหมือนกับสูตรอาหารชนิดแข็ง แต่ไม่มีส่วนประกอบของวุ้นผง นำไปให้ความร้อนโดยใช้ หม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.5.1.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น (starter)

ในการเตรียมหัวเชื้อประกอบด้วย อาหารเหลวน้ำมะพร้าว (ตามข้อ 3.5.1.1) ใส่ลงในหลอดทดสอบ 5 มิลลิลิตร แล้วถ่าย *Acetobacter* sp. TISTR 975 1 โคโคโน้จากจานอาหารแข็งน้ำมะพร้าว ลงในหลอดทดสอบที่เตรียมไว้ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ถ่ายเชื้อจากหลอดทดสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตรบรรจุในขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สามารถนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นของการทดลองต่อไป

3.5.2. การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp. TISTR 975

ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน

3.5.2.1 ศึกษาอัตราเร็วในการหมุนถังหมักต่อการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน

เลี้ยง *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว (ตามข้อ 3.5.1.1) ปริมาตร 1.5 ลิตร โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการหมุนของถังหมักตลอดเวลา โดยแปรความเร็วรอบเป็น 5 10 และ 15 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

ติดตามผลการทดลองโดยทำการวัด

- oxygen transfer rate โดยวิธี static gassing out method (Stanbury et al., 1995) (ภาคผนวก ข.)

- cell content โดยวิธี viable plate count (ภาคผนวก ข.)

- sugar utilization (Dubois et al., 1956) (ภาคผนวก ข.)

- pH โดยใช้ pH meter (ภาคผนวก ข.)

- dissolved oxygen โดยใช้ DO probe (ภาคผนวก ข.)

- gluconic acid โดยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข.)

- acidity (AOAC ,1990) (ภาคผนวก ข.)

- cellulose content (Watanabe and Yamanaka ,1995) (ภาคผนวก ข.)

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's multiple new range test

3.5.2.2. ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์จาก *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน

เลี้ยง *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว(ตามข้อ 3.5.1.1) ปริมาตร 1.5 ลิตร โดยแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการหมุนของถังหมักตลอดเวลา โดยใช้ความเร็ว 5 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

ติดตามผลการทดลองโดยทำการวัด

- cell content โดยวิธี viable plate count (ภาคผนวก ข.)
- sugar utilization (Dubois et al., 1956) (ภาคผนวก ข.)
- pH โดยใช้ pH meter (ภาคผนวก ข.)
- gluconic acid โดยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข.)
- acidity (AOAC ,1990) (ภาคผนวก ข.)
- cellulose content (Watanabe and Yamanaka ,1995) (ภาคผนวก ข.)

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's multiple new range test

3.5.2.3 ศึกษาปริมาณสารประกอบไนโตรเจนต่อการผลิตเซลล์จาก *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน

เลี้ยง *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว (ตามข้อ 3.5.1.1) ปริมาตร 1.5 ลิตร ที่แปรปริมาณสารแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 0.0 , 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการหมุนของถังหมักตลอดเวลา โดยใช้ความเร็ว 5 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

ติดตามผลการทดลองโดยทำการวัด

- cell content โดยวิธี viable plate count (ภาคผนวก ข.)
- sugar utilization (Dubois et al., 1956) (ภาคผนวก ข.)
- pH โดยใช้ pH meter (ภาคผนวก ข.)
- nitrogen utilization โดยวิธี kjeldhal (ภาคผนวก ข.)
- acidity (AOAC ,1990) (ภาคผนวก ข.)
- cellulose content (Watanabe and Yamanaka ,1995) (ภาคผนวก ข.)

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's multiple new range test

3.5.2.4 ศึกษาปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเซลล์จาก *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน

เลี้ยง *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว (ตามข้อ 3.5.1.1) โดยแปรปริมาณเป็น 1.0 1.5 และ 2.0 ลิตร เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการหมุนของถังหมักตลอดเวลา โดยใช้ความเร็ว 5 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

ติดตามผลการทดลองโดยทำการวัด

- cell content โดยวิธี viable plate count (ภาคผนวก ข.)
- sugar utilization (Dubois et al., 1956) (ภาคผนวก ข.)
- pH โดยใช้ pH meter (ภาคผนวก ข.)
- gluconic acid โดยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข.)
- acidity (AOAC ,1990) (ภาคผนวก ข.)
- cellulose content (Watanabe and Yamanaka ,1995) (ภาคผนวก ข.)

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's multiple new range test

3.5.3 ศึกษาเปรียบเทียบการสร้างเซลล์ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอก กับสภาวะนิ่งและเขย่า

เลี้ยง *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว (ตามข้อ 3.5.1.1) ปริมาตร 1.5 ลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 % โดยแปรสภาวะเป็นถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน หมุนด้วยความเร็ว 5 รอบต่อนาที สภาวะนิ่งและเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

ติดตามผลการทดลองโดยทำการวัด

- oxygen transfer rate โดยวิธี static gassing out method (Stanbury et al., 1995) (ภาคผนวก ข.)
- cell content โดยวิธี viable plate count (ภาคผนวก ข.)
- sugar utilization (Dubois et al., 1956) (ภาคผนวก ข.)
- pH โดยใช้ pH meter (ภาคผนวก ข.)
- dissolved oxygen โดยใช้ DO probe (ภาคผนวก ข.)
- gluconic acid โดยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข.)
- acidity (AOAC ,1990) (ภาคผนวก ข.)
- cellulose content (Watanabe and Yamanaka ,1995) (ภาคผนวก ข.)
- วัด turbidity ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Masaoka et al.,1993) (ภาคผนวก ข.)
- syneresis (Okiyama et al.,1992) (ภาคผนวก ข.)
- การสร้างร่างแหเซลล์ด้วยเครื่อง scanning electron microscope (SEM)

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's multiple new range test

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

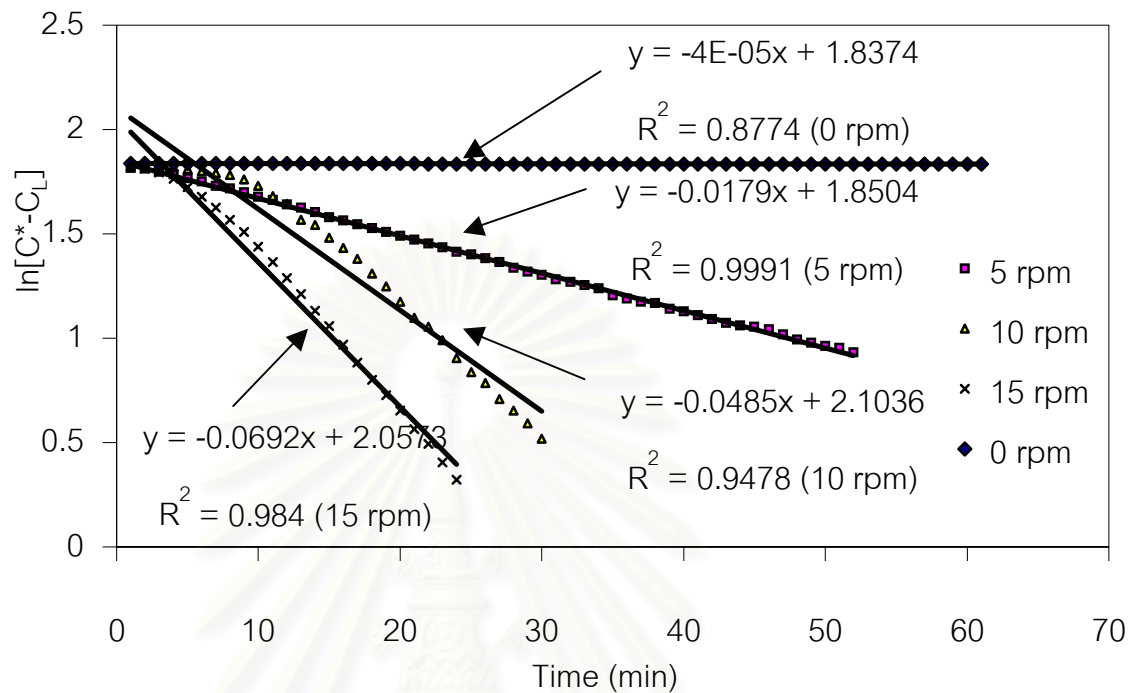
4.1 ผลของความเร็วยุโรปต่อการสร้างเซลล์ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975

ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน

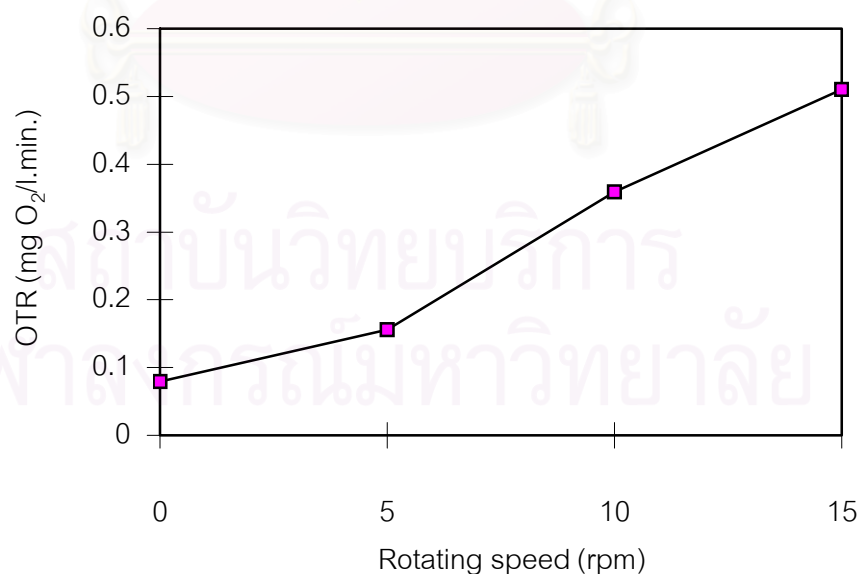
ถังหมัก (fermenter) เป็นอุปกรณ์ หรือหน่วยของกระบวนการหมักในระดับห้องปฏิบัติการ และอุตสาหกรรม ถังหมักมีส่วนประกอบต่างๆ หลายส่วน ได้แก่ ตัวถังหมัก ท่อพ่นอากาศ แผ่นกั้น และ ส่วนประกอบที่มีความสำคัญต่อการถ่ายโอนออกซิเจนภายในถังหมัก คือ ไบโกล (Scragg, 1991) ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเซลล์จาก *Acetobacter* sp. TISTR 975 โดยใช้ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน การหมุนของตัวถังหมักเปรียบได้กับไบโกลเนื่องจากมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการถ่ายโอนมวลสารของระบบโดยเฉพาะออกซิเจนให้แก่ระบบการหมัก (Tanaka et al., 1983)

เมื่อแปรความเร็วยุโรปในการหมุนตัวถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนอยู่ในช่วง 0-15 รอบต่อนาที เพื่อศึกษาอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน (oxygen transfer rate , OTR) ในอาหารเหลว น้ำมะพร้าว โดยวิธี static gassing out method (Stanbury et al.,1995) จากการทดลองเมื่อพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln [C^*-C_t]$ กับเวลา(นาที) และพิจารณาความชันของกราฟ ซึ่งจะแสดงค่า volumetric oxygen transfer coefficient (K_La) เป็นค่าที่บ่งบอกประสิทธิภาพของระบบการให้อากาศต่อถังหมัก และเป็นค่าที่ใช้ในการปรับปรุงการให้อากาศให้เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อจุลินทรีย์ การศึกษาอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนนี้ ไม่มีการให้อากาศ (aeration) แก่ระบบ แต่อาศัยการแพร่ของอากาศ (diffusion) ซึมผ่านสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะมีการให้แรงกลแก่ระบบ จากการทดลองพบว่า ค่าดังกล่าวเพิ่มขึ้นเมื่อความเร็วยุโรปในการหมุนตัวถังเพิ่มขึ้น โดยความเร็วยุโรปเท่ากับ 15 รอบต่อนาทีที่มีค่า K_La สูงสุดเท่ากับ 0.0692 (นาที)⁻¹ รองลงมาคือที่ 10 5 และ 0 รอบต่อนาที มีค่า K_La เท่ากับ 0.0485 0.0179 และ 4.0×10^{-5} (นาที)⁻¹ ตามลำดับ ส่งผลทำให้ค่าอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนของระบบ (OTR) (ค่า OTR ได้จากสมการ $OTR = C^*K_La$,ภาคผนวก ข) เพิ่มขึ้นด้วย เมื่อความเร็วในการหมุนตัวถังเพิ่มขึ้นโดยความเร็วยุโรปเท่ากับ 15 รอบต่อนาทีที่มีค่า OTR สูงสุดเท่ากับ 0.4588 มิลลิกรัม ออกซิเจน (ลิตร นาที)⁻¹ รองลงมาคือที่ 10 5 และ 0 รอบต่อนาที มีค่า OTR เท่ากับ 0.3216 0.1187 และ 2.65×10^{-4} มิลลิกรัมออกซิเจน (ลิตร นาที)⁻¹ ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tanaka และคณะ (1986) ศึกษาการใช้ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ของพีช พบว่าการเพิ่มขึ้นของความเร็วรอบในการหมุนตัวถัง ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจนเพิ่มขึ้นเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 11 และ 12

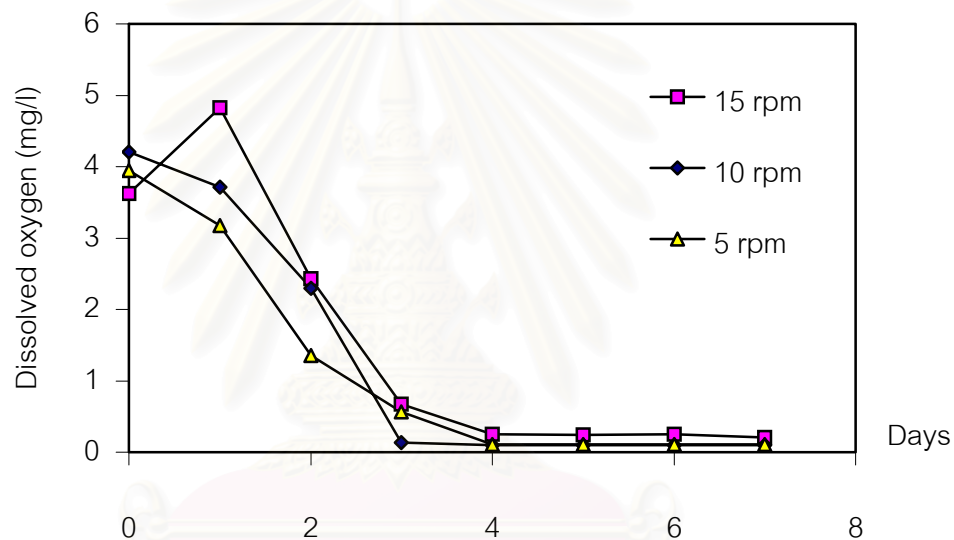


รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln [C^*-C_L]$ กับ เวลา (นาที) ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว เมื่อแปรความเร็วในการหมุนถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน



รูปที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน (OTR) ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว กับความเร็วในการหมุนถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน

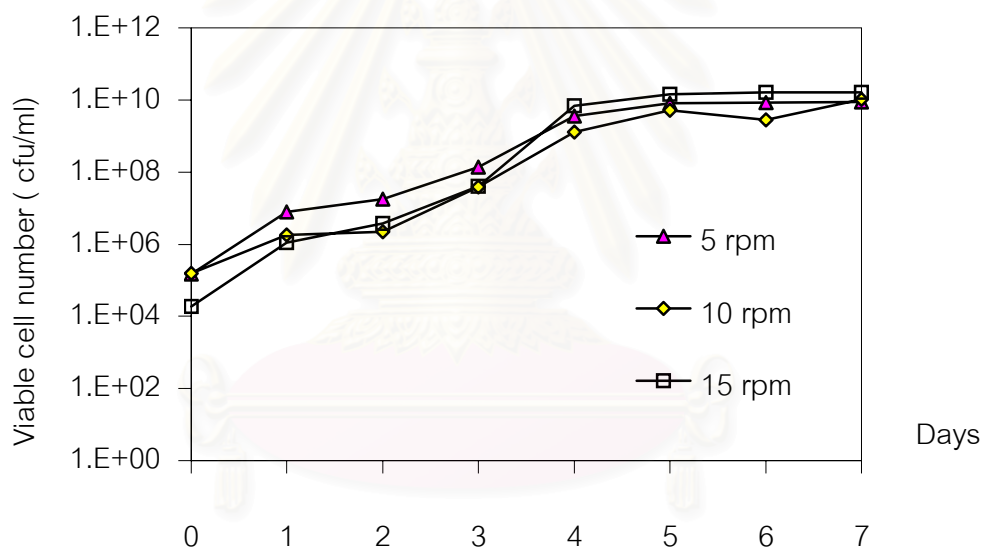
การเลี้ยงแบคทีเรีย *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน จากการทดลองพบว่า การลดลงของออกซิเจนในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวในช่วงระยะเวลาของการหมัก 3 วันแรก การใช้ความเร็วรอบเท่ากับ 15 รอบต่อนาที มีค่าการละลายออกซิเจนลดลงน้อยที่สุด โดยการหมักมีผลทำให้ค่าการละลายของออกซิเจนในวันที่ศูนย์เท่ากับ 3.62 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มขึ้นเป็น 4.83 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 และมีค่าเข้าใกล้ศูนย์หลังจากวันที่ 4 และพิจารณาเปรียบเทียบการลดลงของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า อัตราการลดลงของออกซิเจนที่ความเร็วรอบเท่ากับ 15 รอบต่อนาทีมีน้อยที่สุด รองลงมาคือ 10 และ 5 รอบต่อนาที ตามลำดับ ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 ค่าการละลายของออกซิเจน (dissolved oxygen) ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว เมื่อแปรความเร็วรอบในการหมุนถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อเมตาบอลิซึมของเชื้อ โดยออกซิเจนเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชันสารอาหารไปเป็นพลังงาน ATP สำหรับการทำกิจกรรมต่างๆของเซลล์ ได้แก่ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การสร้างกรดต่างๆ และการสร้างเซลล์ลูไลส เป็นต้น สำหรับงานวิจัยนี้จะติดตามสารเมตาโบไลต์ที่เชื้อสร้างขึ้น คือ กรดอะซิติก กรดกลูโคนิก และเซลล์ลูไลส สำหรับผลของความเร็วรอบในการหมักตัวถึงต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อในรูป viable cell numbers ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว จากการทดลองพบว่า การหมักตัวถึงด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 15 รอบต่อนาที มีอัตราการเพิ่มจำนวนของเชื้อในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว (พิจารณาจากความชันของกราฟ) สูงสุด

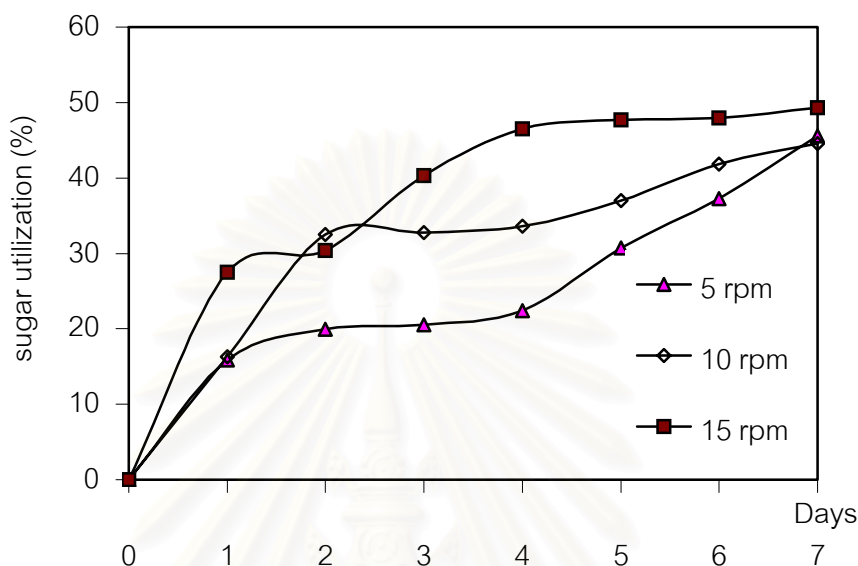
ในช่วง log phase หรือในช่วงวันที่ 0 ถึงวันที่ 4 เท่ากับ $1.2 \log \text{ cfu/day}$ ส่วนการหมุนตัวถังด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 10 และ 5 รอบต่อนาที โดยมีอัตราการเพิ่มจำนวนเท่ากับ 0.75 และ $1 \log \text{ cfu/day}$ ตามลำดับ ผลดังแสดงในรูปที่ 14 จะเห็นว่าความเร็วในการหมุนตัวถังหมักเพิ่มขึ้น มีผลให้ค่าการละลายออกซิเจนและอัตราการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Dudman (1960) พบว่าการเขย่าที่ 224 รอบต่อนาที มีผลให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีอัตราการเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักมากกว่าสถานะนิ่ง เนื่องจากการเขย่าเป็นแรงกลที่ให้แก่ระบบเพื่อเพิ่มการถ่ายโอนออกซิเจน ในขณะที่ อังคณา พันธุ์ศรี (2540) ศึกษาค่าการละลายของออกซิเจนของการหมักแบบสภาวะเขย่า โดยแปรความเร็วรอบของการเขย่าในช่วง 50-150 รอบต่อนาที พบว่า ความเร็วรอบที่ 150 รอบต่อนาที มีค่าการละลายของออกซิเจนสูงสุดส่งผลให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในช่วง 48 ชั่วโมงมีค่ามากที่สุดเช่นกัน



รูปที่ 14 การเพิ่มจำนวนของเชื้อในรูป viable cell numbers เมื่อแปรความเร็วรอบในการหมักถึงหมัก ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

ในอาหารเหลว น้ำมะพร้าว ประกอบด้วยสารอาหารคาร์บอนที่สำคัญคือน้ำตาล ซึ่งเติมลงไปในรูปแบบซูโครส โดยซูโครสจะถูกเอ็นไซม์ sucrose pyrophosphorylase คัดตะไลส์เป็นกลูโคสและฟรุกโตสจากนั้นเข้าสู่กระบวนการใช้สารอาหารเพื่อสร้างพลังงาน ATP และเป็นสารตั้งต้นของสาย polyglucan chain ของเส้นใยเซลลูโลส (Tonchi, Horinouchi et al., 1998) จากการทดลองพบว่า เมื่อความเร็วรอบในการหมักเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้เชื้อใช้น้ำตาลเพิ่มขึ้น โดยความเร็ว

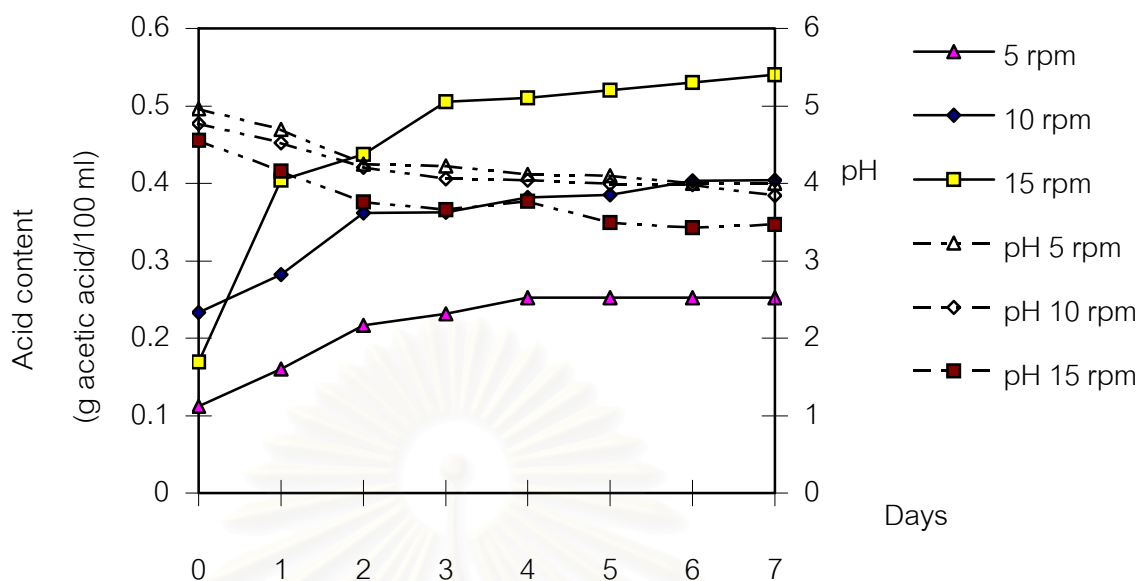
รอบเท่ากับ 15 รอบต่อนาที มีอัตราการใช้น้ำตาลสูงสุด รองลงมาคือ 10 และ 5 รอบต่อนาที ดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 15 การใช้น้ำตาลของเชื้อ เมื่อแปรความเร็วรอบในการหมუნถึงหมัก ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

สารอาหารคาร์บอน หรือน้ำตาลในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวจะถูกนำไปใช้ในการสร้างสารเมตาโบไลต์ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดกลูโคนิก และเซลลูโลส จากการทดลองพบว่า การใช้ความเร็วรอบในการหมუნตัวถึงเท่ากับ 15 รอบต่อนาที เชื้อมีพฤติกรรมในการสร้างกรดอะซิติกสูงกว่าการใช้ความเร็วรอบ 10 และ 5 รอบต่อนาที ตามลำดับ สำหรับค่าพีเอชมีแนวโน้มตามปริมาณกรดที่เชื้อสร้างขึ้นเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 16

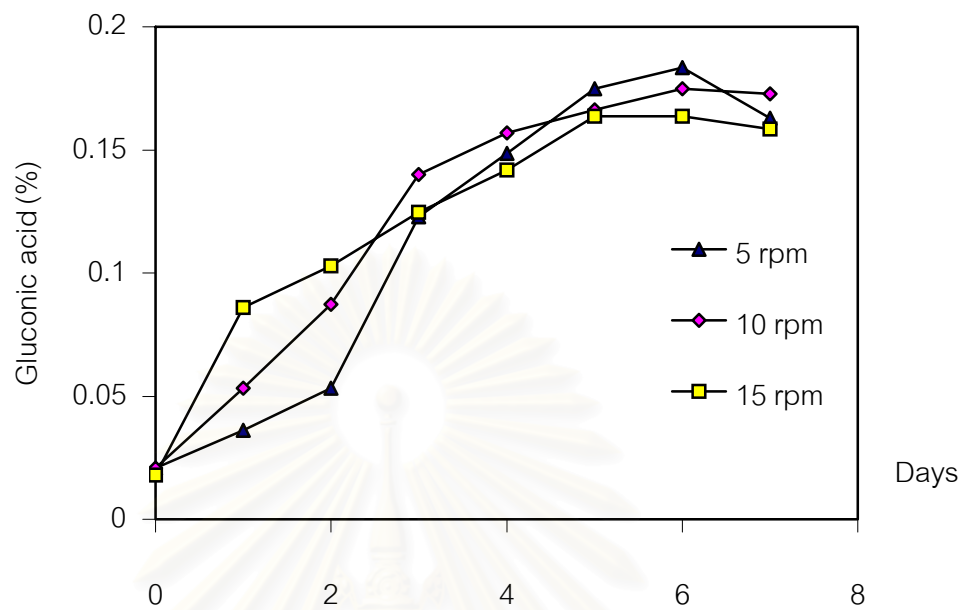
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



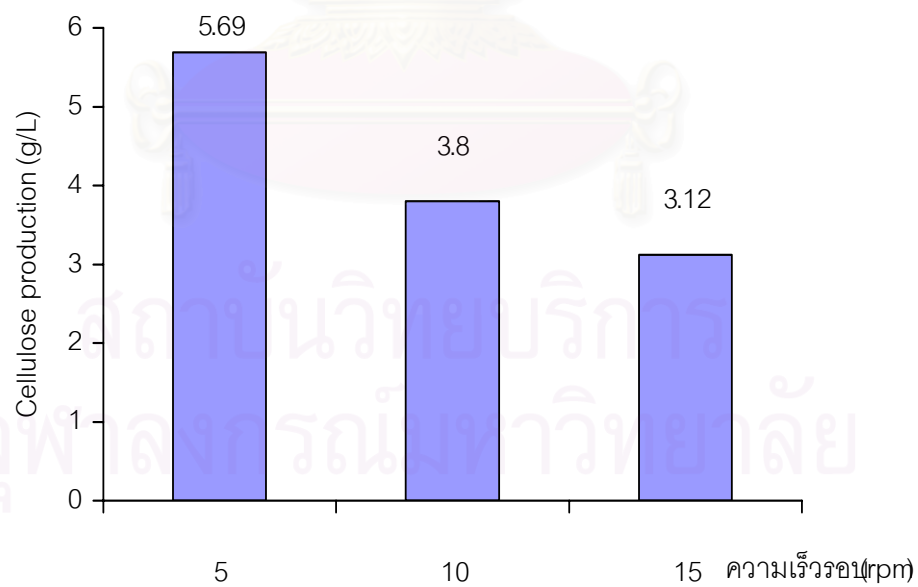
รูปที่ 16 pH และ acid content ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว เมื่อแปรความเร็วรอบในการหมุน ถังหมัก ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

เมื่อเพิ่มความเร็วในการหมุนถังหมักทำให้มีผลต่อปริมาณออกซิเจนซึ่งละลายในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว มีปริมาณมากเกินกว่าที่เชื้อต้องการ จึงส่งผลทำให้เกิดปฏิกิริยา non-phosphorylation oxidation โดยเอนไซม์ dehydrogenase เปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิกมากขึ้น (Asai, 1968) และมีการสร้างเซลล์ลิวสลดลง จากการทดลองพบว่า อัตราการสร้างกรดกลูโคนิกของเชื้อในช่วง 48 ชั่วโมง ณ ความเร็วรอบเท่ากับ 15 รอบต่อนาที มีปริมาณกรดกลูโคนิกสูงสุดสอดคล้องกับค่าการละลายของออกซิเจนที่มีมากในช่วงเวลาดังกล่าว (รูปที่ 13) ดังแสดงในรูป 17 และจะเห็นว่า การสร้างกรดกลูโคนิกในวันที่ 7 ลดลงเนื่องจากกรดกลูโคนิกถูกใช้ป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรด α -2,5-ketogluconic acid (Asai, 1968)

สำหรับผลของความเร็วในการหมุนถังหมักต่อผลผลิตเซลล์ลิวส พบว่าความเร็วในการหมุนเพิ่มขึ้น ทำให้ผลผลิตเซลล์ลิวสที่ *Acetobacter xylinum* สร้างจะลดลง โดยความเร็วในการหมุนเท่ากับ 5 รอบต่อนาที มีผลผลิตเซลล์ลิวสสูงสุดเท่ากับ 5.69 กรัมต่อลิตร (กรัมน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) รองลงมา คือ ความเร็วรอบเท่ากับ 10 และ 15 รอบต่อนาที มีผลผลิตเซลล์ลิวสเท่ากับ 3.80 และ 3.12 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 18

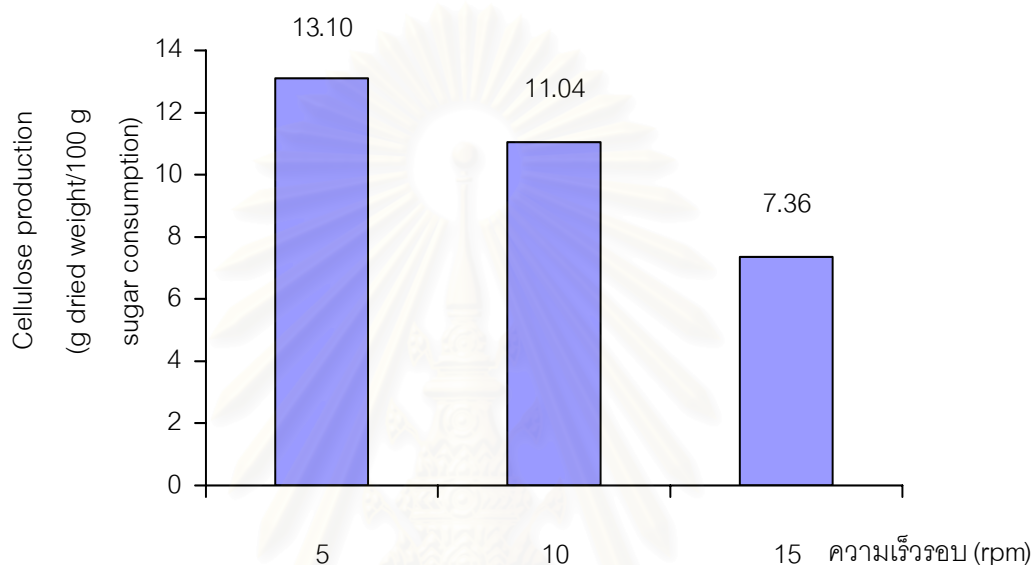


รูปที่ 17 ปริมาณกรดกลูโคนิกที่เชื้อสร้างขึ้น เมื่อแปรความเร็วรอบในการหมუნถังหมัก ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 18 ผลผลิตเซลลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรความเร็วในการหมუნถังหมัก ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ที่ความเร็วในการหมุนตัวถังเท่ากับ 5 รอบต่อนาที มีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 13.10 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำตาล รองลงมา คือ ความเร็วรอบเท่ากับ 10 และ 15 รอบต่อนาที มีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 11.01 และ 7.36 กรัมเซลลูโลสต่อ 100 กรัม น้ำตาล ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 19 อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรความเร็วในการหมุนตัวถัง ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

จากการทดลองพบว่า เมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้น ทำให้ผลผลิตเซลลูโลสลดลง เนื่องจากความเร็วรอบที่เพิ่มขึ้นส่งผลทำให้ค่าการละลายออกซิเจนในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวมีสูง ทำให้จำนวนเชื้อเพิ่มมากขึ้น (Dudman, 1960) ไปพร้อมกับการใช้น้ำตาลในปริมาณมากสำหรับสร้างกรดอะซิติก และกรดกลูโคนิกมากขึ้น และเชื้อมีพฤติกรรมการสร้างเซลลูโลสในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน โดยเชื้อจะสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสติดกับตัวฝาและผนังส่งผลให้เซลล์ของ จุลินทรีย์ในแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้รับออกซิเจนในขณะที่ถังหมักขึ้นและได้รับอาหารในขณะที่ถังหมักลง และเมื่อความเร็วในการหมุนตัวถังมีมากส่งผลให้ระยะเวลาในการสัมผัสอากาศและอาหารมีน้อยทำให้ผลผลิตเซลลูโลสลดลง ลักษณะการสร้างเซลลูโลส ดังแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 20 แผ่นวุ้นเซลล์ูโลสของ *Acetobater* sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน

เมื่อนำค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 ของการผลิตมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพบว่า ความเร็วรอบในการหมุนถังหมักส่งผลให้ค่าต่างๆ เกิดความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ค่าดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อความเร็รรอบในการหมუნถังหมักต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

Characteristic	ความเร็รรอบ (รอบต่อนาที)		
	5	10	15
Wet weight (g/l)	362.00 ^a ±36.4	335.17 ^a ±27.35	236.37 ^b ±4.75
Sugar utilization (%) ^{ns}	45.58±2.74	44.52±2.17	49.30±2.69
Acid content (g acetic acid /100 ml media)	0.138 ^b ±0.01	0.171 ^b ±0.03	0.371 ^a ±0.04
Gluconic acid production (%)	0.163 ^b ±0.02	0.173 ^a ±0.08	0.159 ^c ±0.03
Cellulose (g dried weight / 1 l media)	5.69 ^a ±0.18	3.80 ^b ±0.58	3.12 ^b ±0.25
Cellulose production (g / 100 g sugar consumption)	13.10 ^a ±2.16	11.04 ^a ±1.68	7.36 ^b ±0.58

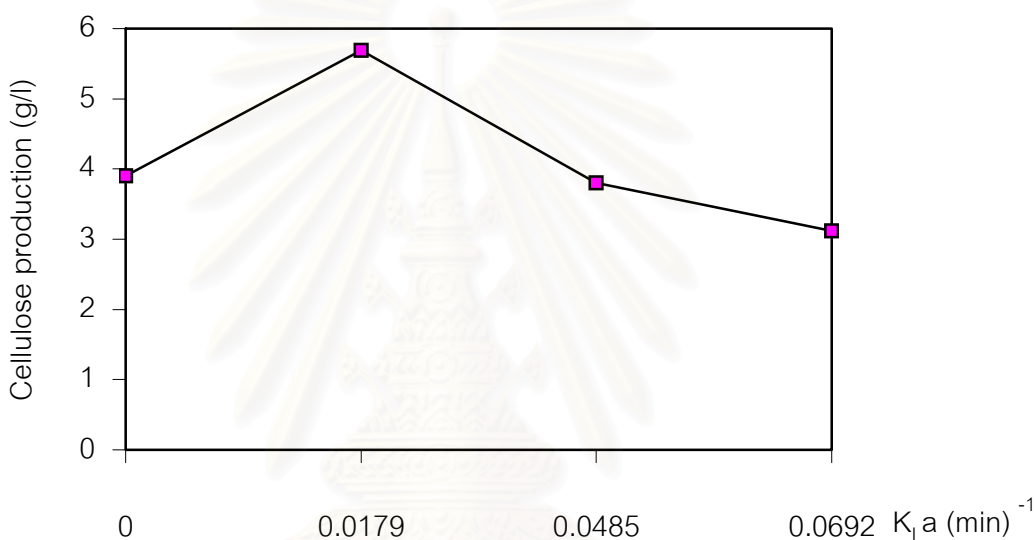
ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

abc อักษรกำกับต่างกันในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 3 ผลผลิตเซลลูโลสมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับความเร็รรอบในการหมუნถังหมัก คือ การใช้ความเร็รรอบในการหมუნถังหมักต่ำ ส่งผลทำให้ได้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด โดยพบว่าความเร็รรอบเท่ากับ 5 รอบต่อนาที ให้ผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 5.69 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Krystynowicz และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* E25 โดยใช้ horizontal fermenter หรือ rotating disk fermenter พบว่าความเร็รรอบที่ช้าที่สุด คือเท่ากับ 4 รอบต่อนาที ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 2.82 กรัมต่อลิตร เนื่องจากความเร็รรอบในการหมუნ plastic discs ช้า ทำให้แผ่นวุ้นเซลลูโลสที่ยึดเกาะอยู่บนผิวหน้า plastic discs สัมผัสกับอากาศได้มากกว่าที่สภาวะความเร็รรอบสูง นอกจากนี้ความเร็รรอบในการหมუნของตัวถังเพิ่มขึ้นส่งผลให้การลดลงของ pH ในระบบการหมักมีมาก แสดงว่าปริมาณกรดที่เชื้อสร้างในระหว่างการผลิตเซลลูโลสของเชื้อมีมากตามไปด้วย จะเห็นว่าการหมუნของตัวถังส่งผลทำให้เชื้อนำสารอาหารคาร์บอนไปสร้างกรดแทนการสร้างเซลลูโลส เนื่องจากการหมუნของตัวถังทำหน้าที่คล้ายกับการใช้ไบโควนหรือไบพัตในถังหมักทั่วไป ที่การ

หมุนด้วยความเร็วยิ่งมาก อัตราการถ่ายโอนมวลสารโดยเฉพาะออกซิเจน (oxygen transfer rate) มีมากตามไปด้วย (Tanaka et al., 1983 ; Kouda et al.,1997) เมื่อระบบการหมักมีปริมาณออกซิเจนมากเกินความต้องการของเชื้อ จะส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิก (gluconic acid) ทำให้เกิดการสะสมของกรดเพิ่มขึ้น pH จึงมีค่าลดลง (Qazi et al.,1993 ; Masaoka et al.,1993 ; Hwang et al.,1999 ; อังคณา พันธุ์ศรี, 2540) และจากการทดลองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจน (K_La) กับผลผลิตเซลลูโลส ดังรูปที่ 21

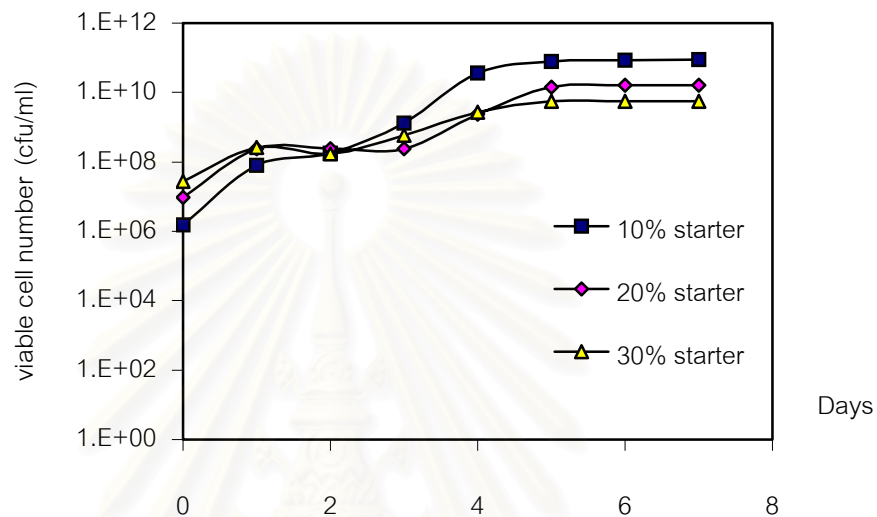


รูปที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจน (K_La) กับผลผลิตเซลลูโลสเมื่อใช้ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนในการหมัก

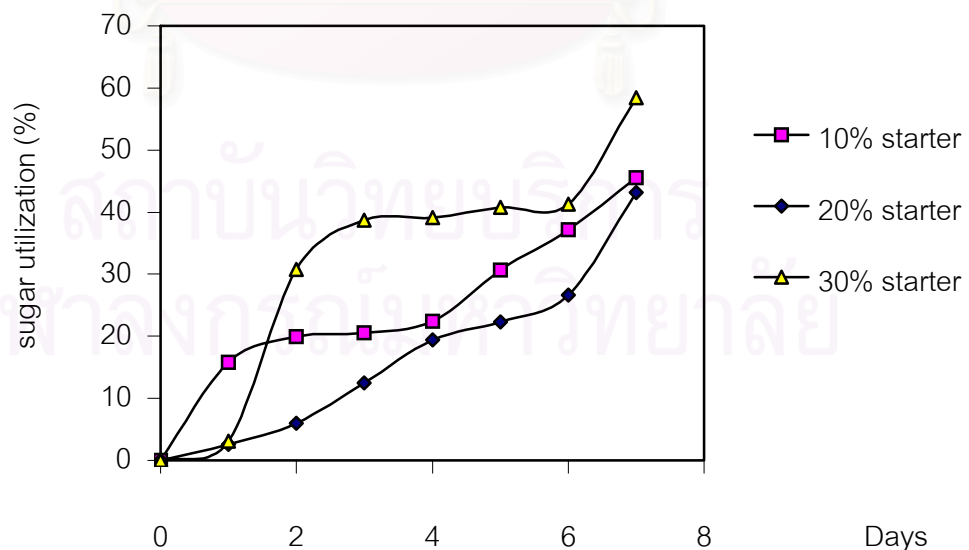
4.2 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน

การผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* เพื่อให้ได้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดนั้น ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต้องเหมาะสมต่อระบบการหมักทั้งในด้านความบริสุทธิ์ของเชื้อ ความแข็งแรงของเชื้อ และปริมาณสารอาหารต่างๆที่มีอยู่ในระบบ เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ของการผลิตเซลลูโลสโดยใช้ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่ความเร็วรอบ 5 รอบต่อนาที เลือกใช้ความเร็วรอบนี้เนื่องจากให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดจากผลการทดลองในข้อ 4.1 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในหัวเชื้อมีเซลล์ทั้งหมดเท่ากับ 1.52×10^8 cfu/ml ใช้ปริมาตรเท่ากับร้อยละ 30 พบว่า วันที่ศูนย์การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์มีจำนวนเชื้อในรูป viable cell

number สูงที่สุดเท่ากับ 2.75×10^7 หลังจากนั้นการไ้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเพิ่มจำนวนของเชื้อในช่วง 4 วันแรก หรือ log phase สูงกว่าการไ้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 22 สำหรับการไ้น้ำตาล พบว่าการไ้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการไ้น้ำตาลสูงสุด รองลงมาคือ การไ้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 23

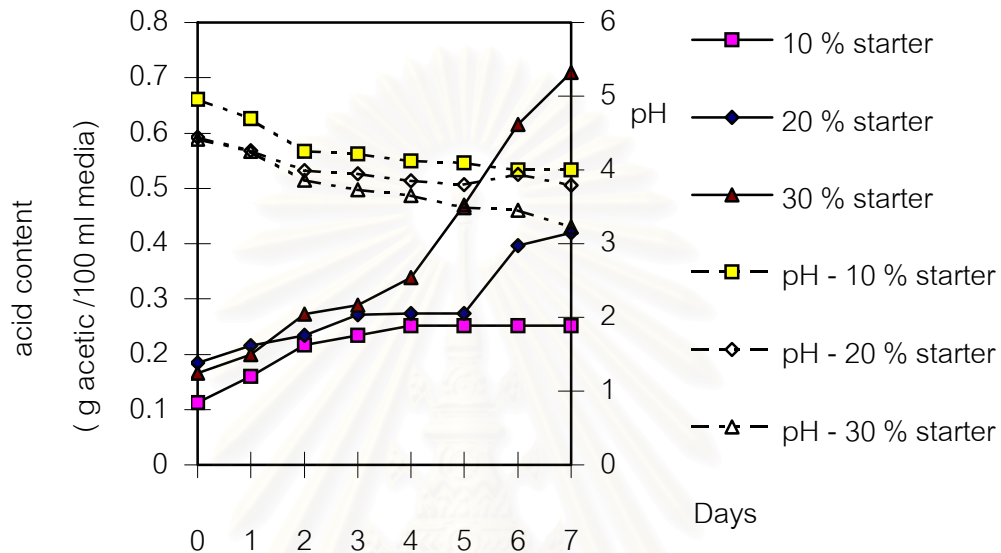


รูปที่ 22 การเพิ่มจำนวนของเชื้อในรูป viable cell numbers เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้น ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 23 การไ้น้ำตาลของเชื้อ เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้น ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

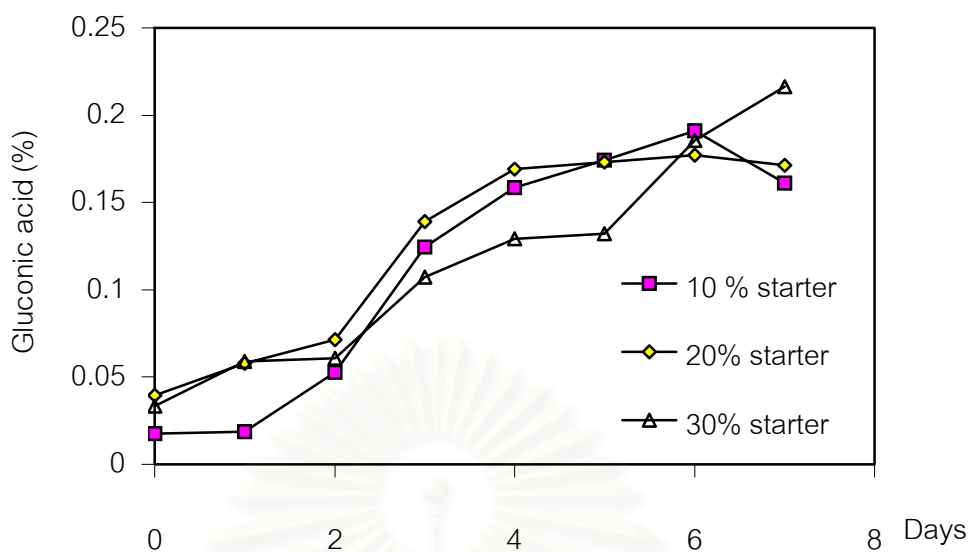
น้ำตาล หรือสารอาหารคาร์บอน เป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรด และเซลล์ูโลส สำหรับการสร้างกรดอะซิติกของเชื้อเมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้นพบว่า การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 30 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการสร้างกรดสูงสุด รองลงมาคือ การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 20 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลดังแสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 24 pH และ acid content ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้น ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

สำหรับปริมาณกรดกลูโคินิกที่เชื้อสร้างขึ้น จากการทดลองพบว่า แนวโน้มการเพิ่มขึ้นของกรดกลูโคินิกในช่วง 4 วันแรก ทั้ง 3 สภาวะ ไม่แตกต่างกัน แต่หลังจากนั้นการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์มีอัตราการสร้างสูงสุด ดังรูปที่ 25

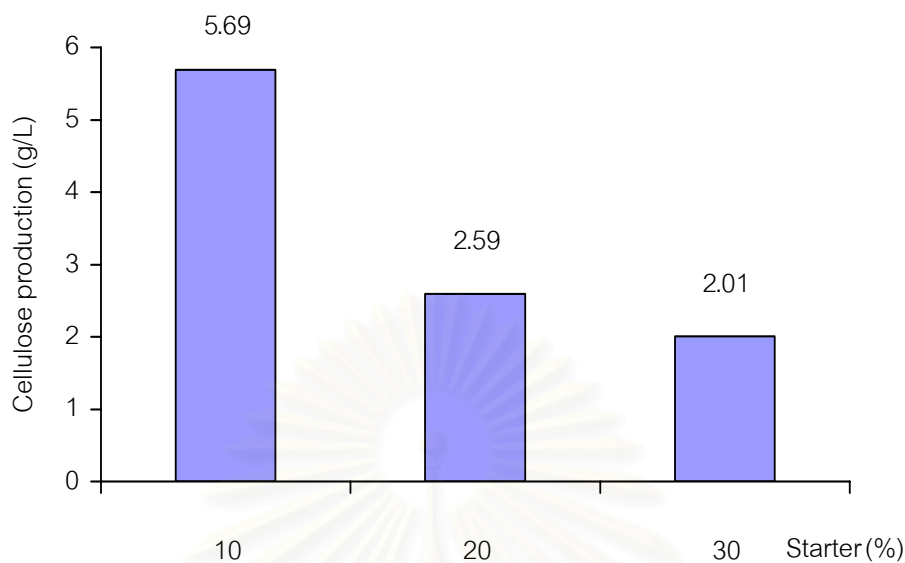
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



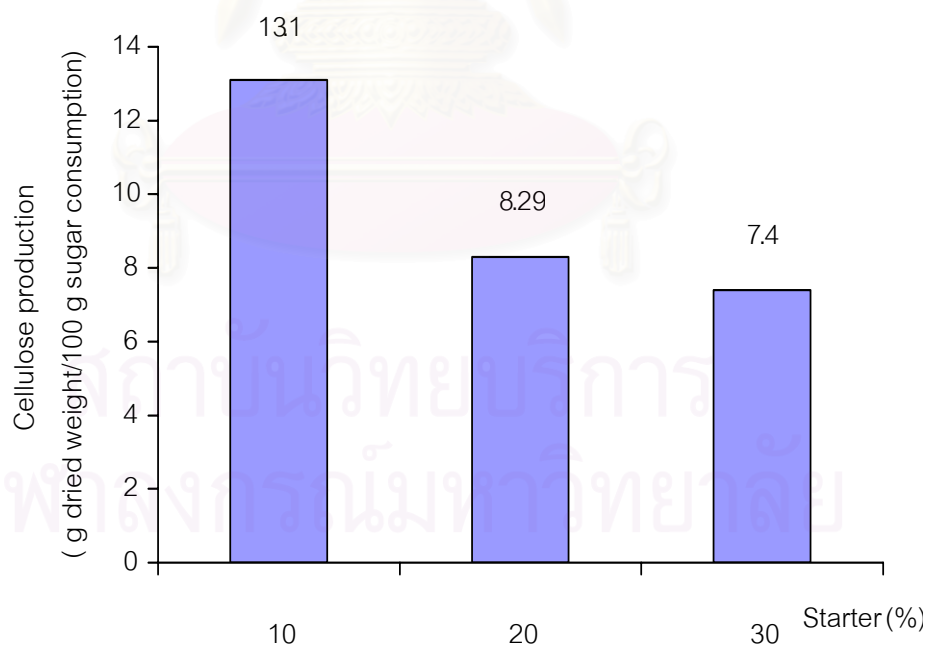
รูปที่ 25 ปริมาณกรดกลูโคนิกที่เชื้อสร้างขึ้น เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้น ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

สำหรับผลผลิตเซลลูโลส ณ วันที่ 7 จากการทดลองพบว่า การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงที่สุดเท่ากับ 5.69 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลส 13.10 กรัมเซลลูโลสต่อ 100 กรัมน้ำตาล รองลงมาคือ การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 2.59 และ 2.01 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลส 8.29 และ 7.40 กรัมเซลลูโลสต่อ 100 กรัม น้ำตาล ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 26 และ 27

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 ผลผลิตเซลลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้นในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 27 อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้นในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 ของการผลิตมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นส่งผลให้ค่าต่างๆ เกิดความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ค่าดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้นในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

Characteristic	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (%)		
	10	20	30
Wet weight (g/l)	362.00 ^a ±36.4	282.50 ^b ±1.5	317.40 ^{ab} ±22.1
Sugar utilization (%)	45.58 ^b ±2.74	43.20 ^b ±2.83	58.47 ^a ±2.4
Acid content (g acetic acid /100 ml media)	0.138 ^c ±0.01	0.236 ^b ±0.01	0.543 ^a ±0.04
Gluconic acid production (%)	0.163 ^b ±0.02	0.170 ^b ±0.08	0.230 ^a ±0.19
Cellulose (g dried weight / 1 l media)	5.69 ^a ±0.18	2.59 ^b ±0.38	2.01 ^c ±0.90
Cellulose production (g / 100 g sugar consumption)	13.10 ^a ±2.16 ^a	8.29 ^b ±0.70	7.40 ^b ±0.32

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

abc อักษรกำกับต่างกันในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าเมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ผลผลิตเซลลูโลสจะลดลง โดยการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด ในขณะที่การใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตเซลลูโลสต่ำที่สุด อาจเนื่องมาจากเชื้อมีพฤติกรรมกรใช้น้ำตาลสำหรับสร้างกรดแทนการสร้างเซลลูโลส สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ สมคิด ธรรมรัตน์ (2531) รายงานว่าเมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้นเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ความหนาและน้ำหนักเปียกของแผ่นวุ้นเซลลูโลสลดลง และ วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ (2536) ทำการเลี้ยง *A. xylinum* ในอาหารเหลวจากน้ำหางนม (whey) พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ให้แผ่นวุ้นเซลลูโลสที่มีน้ำหนักและความหนามากที่สุด การใช้

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มากเกินไปส่งผลทำให้ปริมาณสารอาหารที่มีอยู่ไม่เพียงพอต่อจำนวนประชากรของเชื้อทำให้เกิดภาวะแข่งขัน ส่งผลให้การสร้างเซลล์ลูลิสของเชื้อลดลง (Alaban, 1962)

4.3 ผลของปริมาณสารประกอบไนโตรเจนต่อการสร้างเซลล์ลูลิสของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน

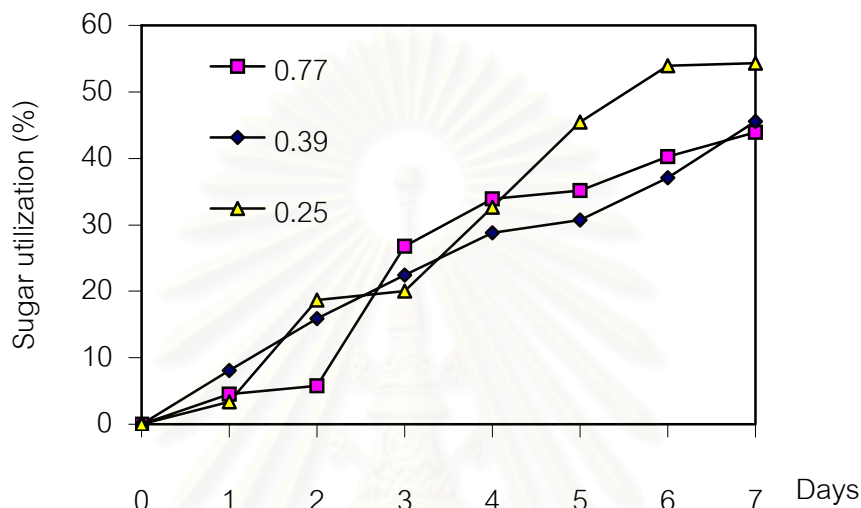
ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรียประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของเชื้อแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน และความต้องการยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นอีกเช่น พีเอช ออกซิเจน และ อุณหภูมิ เป็นต้น ตามธรรมชาติแล้วน้ำมะพร้าวมีสารประกอบไนโตรเจนที่ *Acetobacter xylinum* สามารถเจริญและสร้างเซลล์ลูลิสได้ แต่อย่างไรก็ตามการเติมสารประกอบไนโตรเจนจะช่วยเร่งการเจริญและการสร้างเซลล์ลูลิส โดยสารประกอบไนโตรเจนเกี่ยวข้องกับ nitrogenous regular gene บน cellulose synthase ได้แก่ *acsAB* , *acsC* และ *acsD* และปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่เติมลงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวจะต้องส่งเสริมการใช้น้ำตาลของเชื้อ (Dudman, 1959) เพื่อการสร้างสารเมตาโบไลต์ต่างๆ โดยเฉพาะเซลล์ลูลิส สำหรับงานวิจัยนี้เลือกสารประกอบแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เนื่องจากมีรายงานการวิจัยว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อสร้างเซลล์ลูลิสได้สูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนจากแหล่งอื่น (Lapuz et al., 1967)

สำหรับงานวิจัยนี้แปรปริมาณสารประกอบแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (ADHP) เป็น 0 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละชุดการทดลองมีปริมาณคาร์บอนเริ่มต้น และอัตราส่วนของ C:N ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ของชุดการทดลอง

ชุดการทดลองที่	ปริมาณ ADHP(%)	ปริมาณคาร์บอน (%)	ปริมาณไนโตรเจน (%)	อัตราส่วน C:N
1	0	7.613	9.90	0.77
2	0.1	8.443	21.53	0.39
3	0.2	7.979	32.43	0.25

จากตารางที่ 5 นำมาเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลลูโลส ผลการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของเชื้อในช่วงเวลาการหมักตั้งแต่วันที่ 3 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง อัตราส่วน C:N เท่ากับ 0.25 ส่งเสริมการใช้น้ำตาลของเชื้อมากที่สุด ผลแสดงในรูปที่ 28

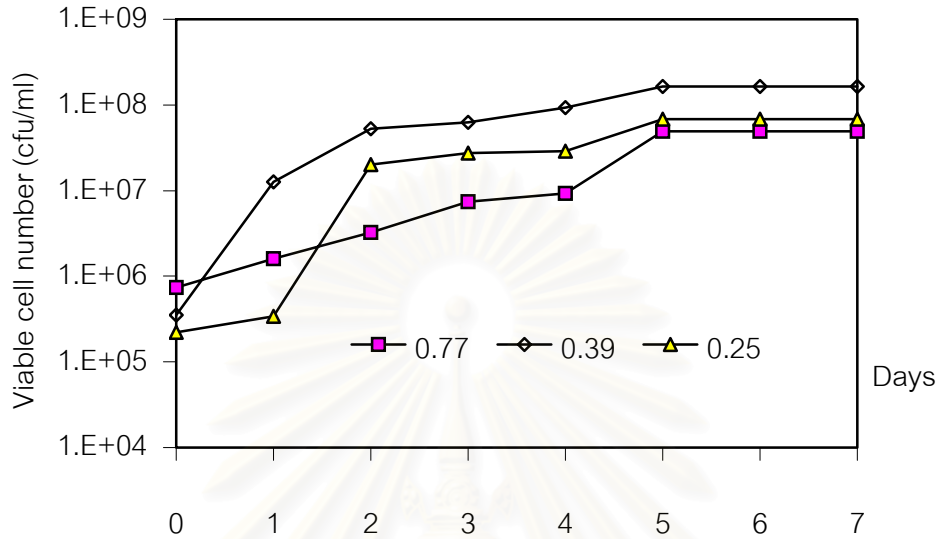


รูปที่ 28 การใช้น้ำตาลของเชื้อ เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

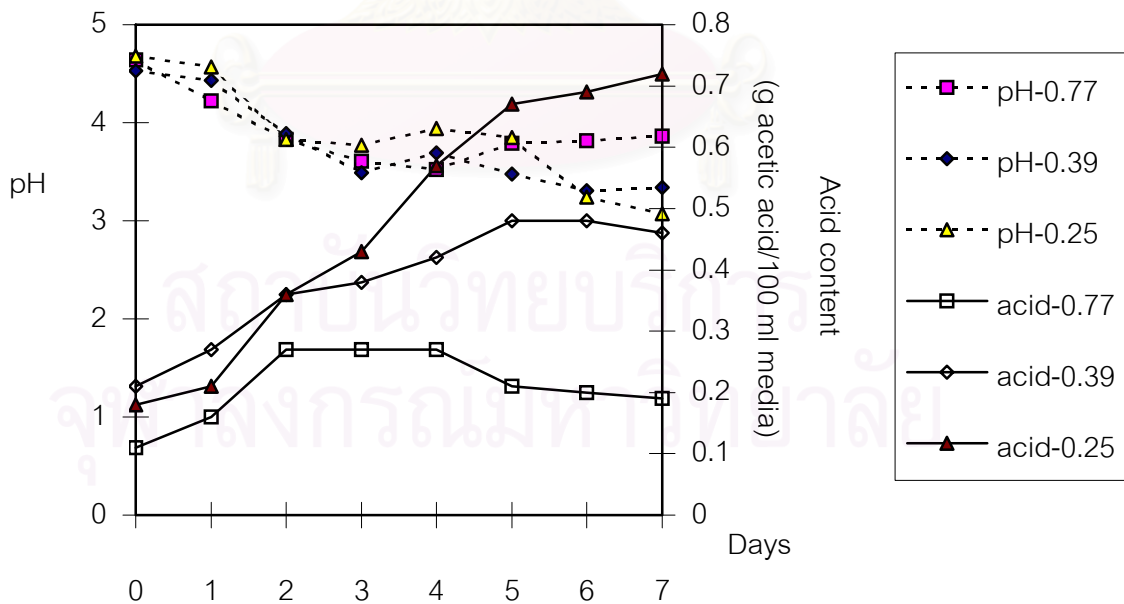
สำหรับผลค่าอัตราส่วน C:N ต่อการเพิ่มจำนวนของ viable cell number ในอาหารเหลว น้ำมะพร้าว จากการทดลองพบว่า ค่าอัตราส่วน C:N เท่ากับ 0.25 มีอัตราการเพิ่มจำนวนของเชื้อในช่วง 3 วันแรก หรือ log phase สูงกว่าการใช้ค่าอัตราส่วน C:N เท่ากับ 0.39 และ 0.77 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 29

สำหรับการสร้างกรดอะซิติกของเชื้อ พบว่า การใช้ค่าอัตราส่วน C:N เท่ากับ 0.25 มีแนวโน้มการสร้างกรดสูงสุดหลังจากวันที่ 3 รองลงมาการใช้ค่าอัตราส่วน C:N เท่ากับ 0.39 และ 0.77 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 30 สอดคล้องกับ Cardona (1994) ศึกษาผลของสารประกอบแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการสร้างเซลลูโลสของ *A. xylinum* โดยแปรค่าอยู่ในช่วง 0-10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปริมาณสารประกอบแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้

ค่าพีเอชของระบบลดลง แสดงว่าปริมาณสารประกอบไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจะส่งเสริมให้เชื้อสร้างกรดเพิ่มขึ้น (Dudman,1959)

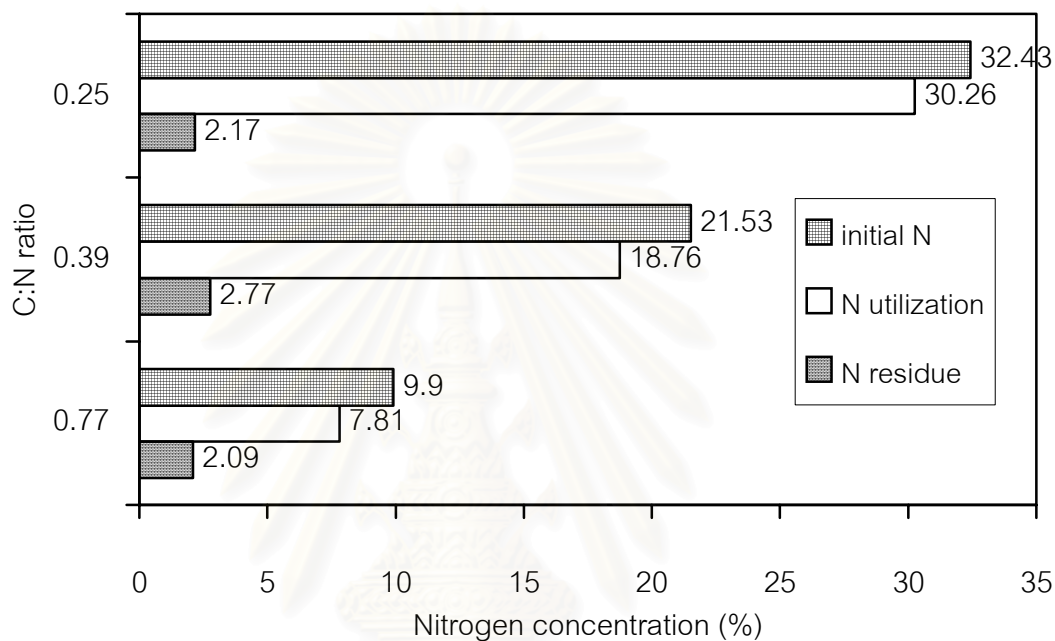


รูปที่ 29 การเพิ่มจำนวนของเชื้อในรูป viable cell numbers เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน



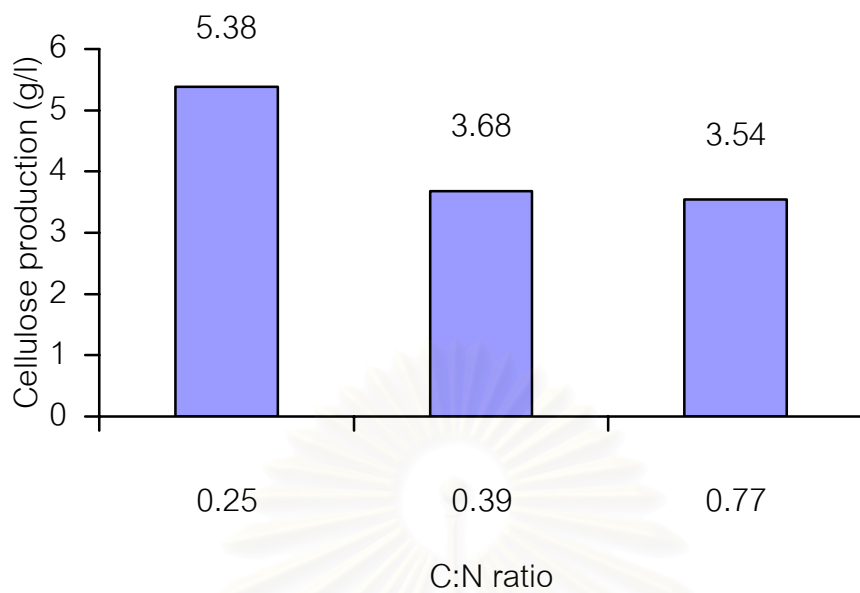
รูปที่ 30 pH และ acid content ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

สำหรับการใช้ในโตรเจนของเชื้อ พบว่า ค่าอัตราส่วน C:N ลดลงการใช้ในโตรเจนของเชื้อเพิ่มขึ้น โดยที่ค่าอัตราส่วน C:N เท่ากับ 0.25 เชื้อมีการใช้สารประกอบไนโตรเจนเท่ากับ 14.49 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ การใช้ค่าอัตราส่วน C:N เท่ากับ 0.39 และ 0.77 มีการใช้ในโตรเจนมีค่าเท่ากับ 8.75 และ 7.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูป 31

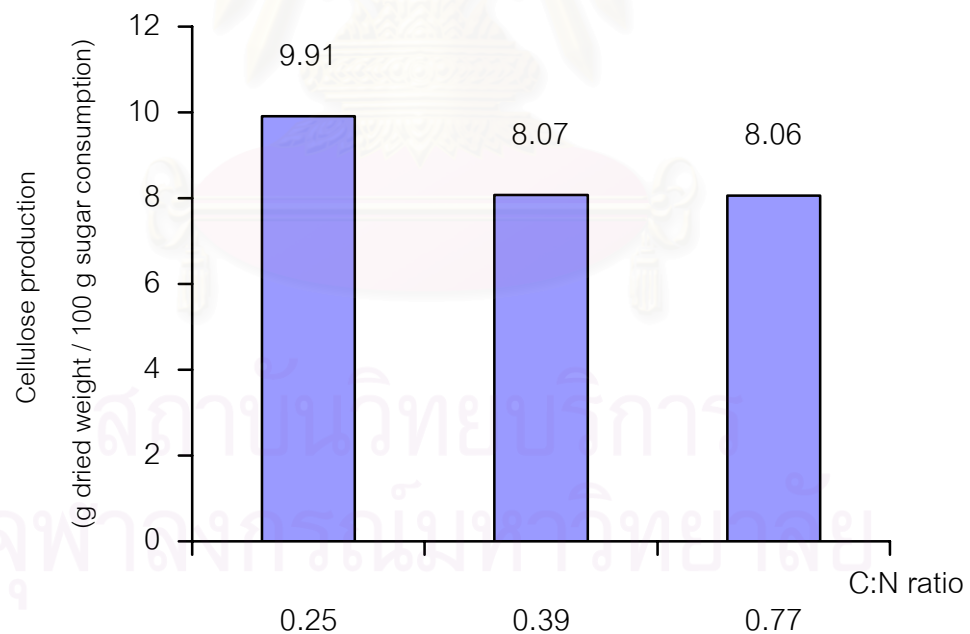


รูปที่ 31 การใช้ในโตรเจน เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ณ วันที่ 7

สำหรับผลผลิตเซลล์ไลส ณ วันที่ 7 จากการทดลองพบว่า ค่าอัตราส่วน C:N เท่ากับ 0.25 ให้ผลผลิตเซลล์ไลสสูงที่สุดเท่ากับ 5.38 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลล์ไลส 9.91 กรัมเซลล์ไลสต่อ 100 กรัมน้ำตาล รองลงมาคือ การใช้ค่าอัตราส่วน C:N เท่ากับ 0.39 และ 0.77 ให้ผลผลิตเซลล์ไลสเท่ากับ 3.68 และ 3.54 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลล์ไลส 8.07 และ 8.06 กรัมเซลล์ไลสต่อ 100 กรัมน้ำตาล ตามลำดับ ผลดังแสดงในรูปที่ 32 และ 33



รูปที่ 32 ผลผลิตเซลลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 33 อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 ของการผลิตมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพบว่า ค่าอัตราส่วน C:N ส่งผลให้ค่าต่างๆ เกิดความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อแปรค่าอัตราส่วน C:N ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

Characteristic	อัตราส่วน C:N		
	0.77	0.39	0.25
Wet weight (g/l)	296.40 ^b ±13.2	219.20 ^c ±5.4	312.41 ^a ±7.20
Sugar utilization (%)	43.91 ^b ±10.4	45.58 ^b ±3.96	54.30 ^a ±2.93
Acid content (g acetic acid /100 ml media)	0.190 ^c ±0.03	0.251 ^b ±0.03	0.540 ^a ±0.02
Nitrogen utilization (%)	7.89 ^b ±0.50	8.75 ^b ±0.71	14.49 ^a ±2.15
Cellulose ^{ns} (g dried weight / 1 L media)	3.54±0.30	3.68±1.82	5.38±0.49
Cellulose production ^{ns} (g / 100 g sugar consumption)	8.06±2.16	8.07±0.58	9.91±0.93

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

abc อักษรกำกับต่างกันในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 6 จะเห็นว่าอัตราส่วน C:N ในอาหารเหลวร่น้ำมะพร้าวมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันตรงกับการใช้น้ำตาล การสร้างกรด การใช้ไนโตรเจนและผลผลิตเซลล์จุลินทรีย์ กล่าวคือเมื่อปริมาณสารประกอบแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เติมลงไปเพิ่มขึ้น มีผลทำให้การใช้น้ำตาลหรือแหล่งคาร์บอนและการใช้ไนโตรเจนของระบบเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น ผลการทดลองสอดคล้องกับ Dudman (1959) ศึกษาแปรปริมาณสารประกอบไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นสารประกอบไนโตรเจนเท่ากับ 0.01 % เป็นระดับต่ำสุดที่ *Acetobacter acetigenum* EA-1 จะเจริญและสร้างเซลล์ได้ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจนเป็น 0.2 % พบว่าเชื้อมีการ

เจริญและการสร้างเซลล์เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกรดอะมิโนส่วนเกินสามารถถูก deamination ให้กลายเป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครป และถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ ส่วนการสร้างกรดของเชื้อที่เพิ่มมากขึ้นนั้น เหตุผลเนื่องจากปกติแอมโมเนียม (NH_4^+) ถูกใช้ไปเหลืออนุมูลของฟอสเฟต (PO_4^{2-}) เกิดการสะสมจะทำให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกรดเพิ่มขึ้น

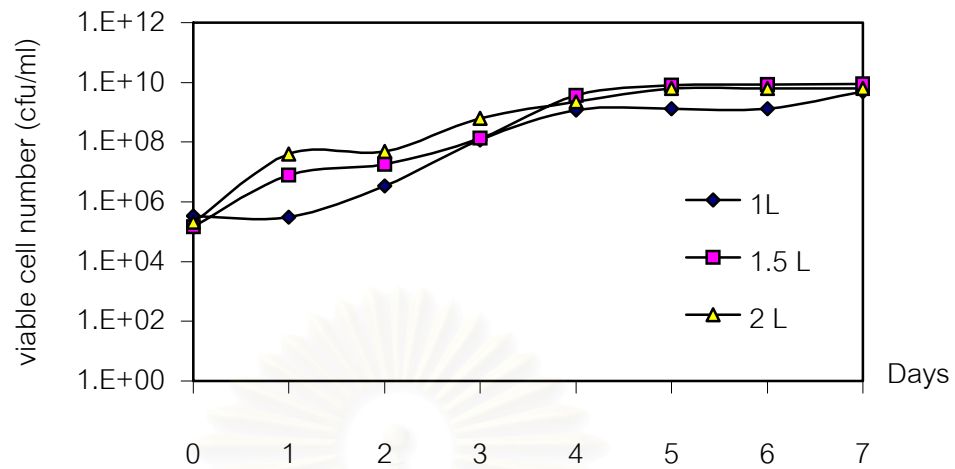
4.4 ผลของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างเซลล์ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน

ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีความสัมพันธ์กับความสูง และพื้นที่ผิวหน้าในการสัมผัสอากาศของอาหารเลี้ยงเชื้อ คือเมื่อปริมาณอาหารในถังหมักเพิ่มขึ้น ความสูง และพื้นที่ผิวหน้าของอาหารที่สัมผัสอากาศจะเพิ่มขึ้นด้วย จากการทดลองแปรปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1.0 1.5 และ 2.0 ลิตร ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนขนาดบรรจุ 22 ลิตร ส่งผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความสูงเมื่อวัดจากก้นถังหมักมีค่าเท่ากับ 2.5 3.5 และ 4.3 เซนติเมตร และพื้นที่ผิวหน้าของอาหารที่สัมผัสอากาศเท่ากับ 451.11 544.17 และ 554.07 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูง และพื้นที่ผิวในการสัมผัสอากาศของอาหารเลี้ยงเชื้อและผนังถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน

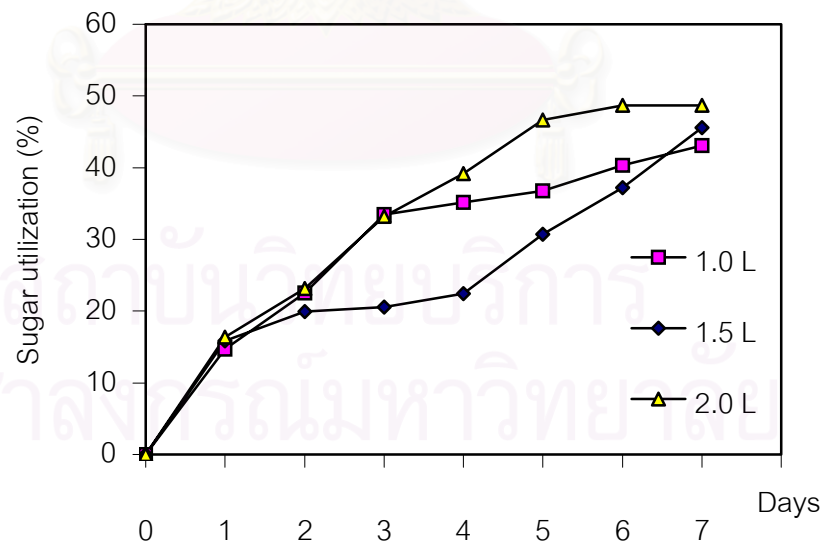
ปริมาณอาหาร (ลิตร)	ความสูงของอาหาร (ซม.)	พื้นที่ผิวหน้าของอาหารที่สัมผัสอากาศ (ตร.ซม.)	พื้นที่ผิวหน้าของผนังถังหมักที่สัมผัสอากาศ (ตร.ซม.)
1.0	2.5	451.11	1704.19
1.5	3.5	544.17	1611.13
2.0	4.3	554.07	1601.23

จากการทดลองแปรปริมาณอาหารเหลวน้ำมะพร้าวเป็น 1 1.5 และ 2 ลิตร พบว่า การเพิ่มจำนวนของเชื้อในรูป viable cell number เมื่อใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1.5 ลิตรมีอัตราการเพิ่มจำนวนสูงสุด รองลงมาคือ 2 ลิตร และ 1 ลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 34



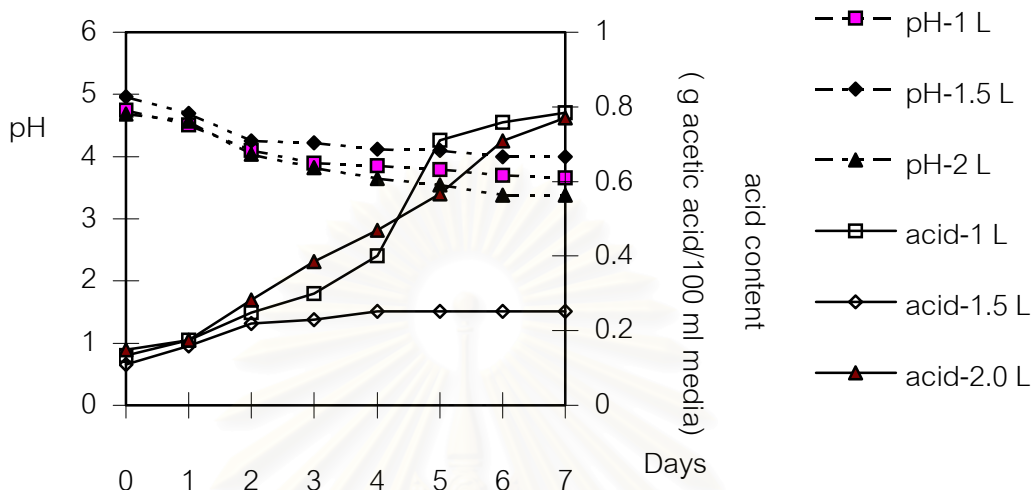
รูปที่ 34 การเพิ่มจำนวนของเชื้อในรูป viable cell numbers เมื่อแปรปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

สำหรับการใช้น้ำตาลของเชื้อ พบว่า หลังจากวันที่ 2 การใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2 ลิตร มีอัตราการใช้น้ำตาลสูงสุด รองลงมาคือ ที่ 1 และ 1.5 ลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 35



รูปที่ 35 การใช้น้ำตาลของเชื้อ เมื่อแปรปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

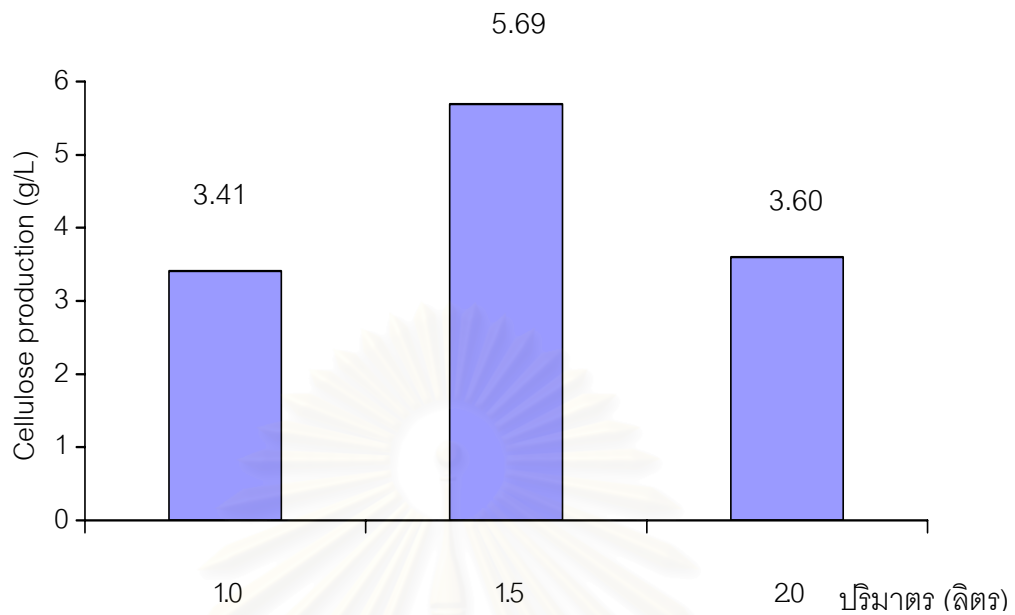
สำหรับการสร้างกรดอะซิติกของเชื้อเมื่อแปรปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า การใช้ ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 2.0 และ 1 ลิตร มีแนวโน้มการสร้างกรดสูงสุดหลังจากวันที่ 3 ในขณะที่ การใช้ปริมาณอาหารเท่ากับ 1.5 ลิตร มีอัตราการสร้างกรดต่ำสุด ดังแสดงในรูปที่ 36



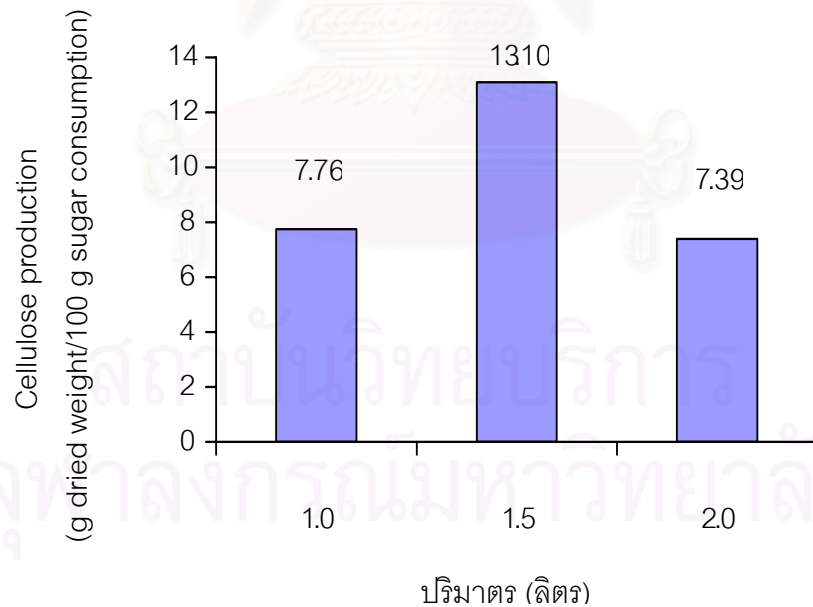
รูปที่ 36 pH และ acid content ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว เมื่อแปรปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

สำหรับผลผลิตเซลล์ลูส ณ วันที่ 7 จากการทดลองพบว่า การใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 ลิตร ให้ผลผลิตเซลล์ลูสสูงสุดเท่ากับ 5.69 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลล์ลูส 13.10 กรัมเซลล์ลูสต่อ 100 กรัมน้ำตาล รองลงมาคือ การใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1.0 และ 2.0 ลิตร ให้ผลผลิตเซลล์ลูสเท่ากับ 3.41 และ 3.60 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลล์ลูส 7.76 และ 7.39 กรัม เซลล์ลูสต่อ 100 กรัมน้ำตาล ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 37 และ 38

เมื่อนำค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 ของการผลิตมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพบว่า ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้ค่าต่างๆ เกิดความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ค่าดังตารางที่ 8



รูปที่ 37 ผลผลิตเซลลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 38 อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลส ณ วันที่ 7 เมื่อแปรปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อแปรปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

Characteristic	ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ (ลิตร)		
	1.0	1.5	2.0
Wet weight (g/l)	218.53 ^b ±29.2	362.00 ^a ±36.4	224.77 ^b ±3.90
Sugar utilization (%)	43.90 ^b ±2.17	45.58 ^a ±2.74	48.71 ^a ±1.59
Acid content (g acetic acid /100 ml media)	0.651 ^a ±0.02	0.138 ^b ±0.01	0.628 ^a ±0.02
Cellulose (g dried weight / 1 l media)	3.41 ^b ±0.82	5.69 ^a ±0.18	3.60 ^b ±1.91
Cellulose production (g / 100 g sugar consumption)	7.76 ^b ±0.82	13.10 ^a ±2.16	7.39 ^b ±1.28

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

abc อักษรกำกับต่างกันในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 7 และ 8 สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของปริมาณอาหารต่อพื้นที่ผิวของอาหารที่สัมผัสอากาศกับผลผลิตเซลลูโลส ได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของปริมาณอาหารต่อพื้นที่ผิวของอาหารที่สัมผัสอากาศ กับผลผลิตเซลลูโลส

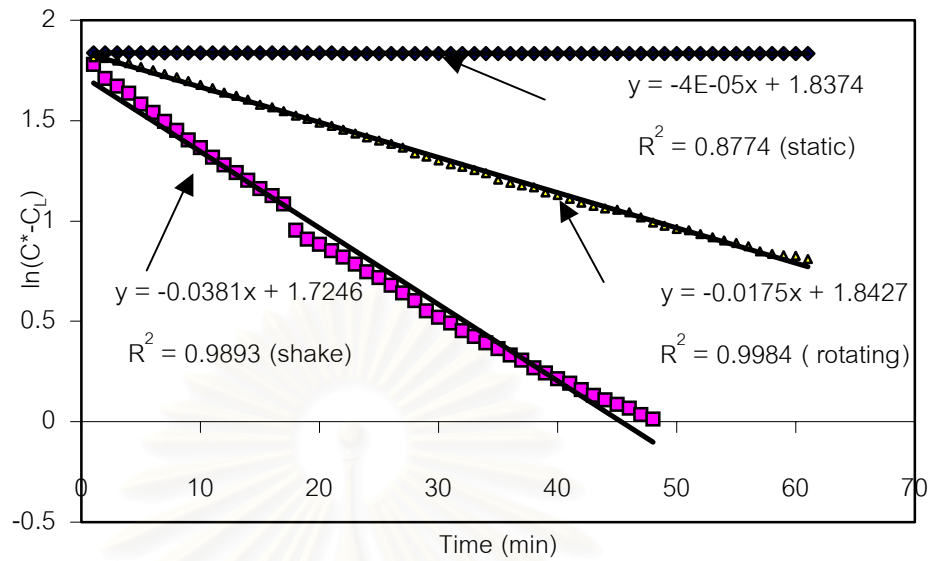
ความสูง (cm)	พื้นที่ผิว อาหารที่ สัมผัสอากาศ (A, cm ²)	ปริมาณ อาหารเลี้ยง เชื้อ (V, ml)	อัตราส่วน V/A (ml/cm ²)	ปริมาณ เซลลูโลส (g/l)	ปริมาณ เซลลูโลส (g/l.cm ²)
2.5	541.11	1000	2.22	3.41	0.0063
3.5	544.17	1500	2.76	5.69	0.0110
4.3	554.07	2000	3.61	3.60	0.0065

จากตารางที่ 9 แสดงให้เห็นว่าค่าความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอัตราส่วน V/A ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนมากกว่า 3.5 เซนติเมตรมีผลทำให้ผลผลิตเซลล์ลดลง และอัตราส่วน V/A เท่ากับ 2.76 ให้ผลผลิตเซลล์สูงสุดในขณะที่ Phunsri และคณะ (2003) พบว่าการเลี้ยง *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในสภาวะนิ่งโดยให้มีอัตราส่วน V/A เท่ากับ 2.50 ให้ผลผลิตเซลล์สูงสุดในงานวิจัยของ Masaoka และคณะ (1993) พบว่า ผลผลิตเซลล์ที่สร้างโดย *A. xylinum* IFO 13693 มีค่าสูงสุดเมื่อความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1.3 เซนติเมตร และเมื่อความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ผลผลิตเซลล์จะลดลง

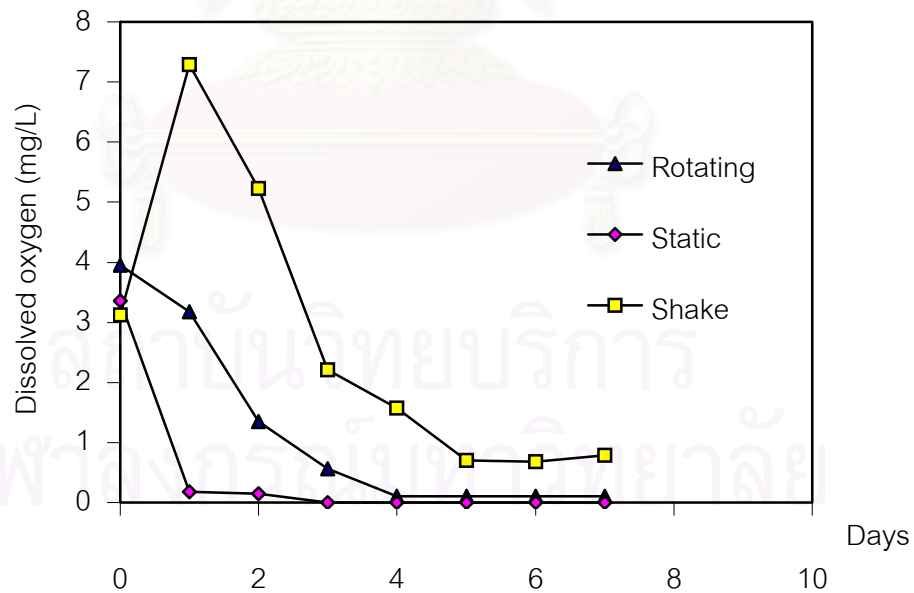
4.5 ผลของการหมักต่อการสร้างเซลล์ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975

สภาวะการหมักที่นำมาใช้ในการศึกษาการสร้างเซลล์ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 ได้แก่ สภาวะนิ่ง (static culture) สภาวะเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที (shake culture) (อังคณา พันธุ์ศรี, 2540) และสภาวะการหมุนของถังตามแนวอน (rotating culture) ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนที่ความเร็ว 5 รอบต่อนาที (ตามผลการทดลองในข้อ 4.1 เนื่องจากให้ผลผลิตเซลล์สูงสุด) ทั้งสามสภาวะมีความแตกต่างกันในด้านทิศทางและขนาดของแรงกลที่ให้แก่ระบบ ส่งผลต่อค่าอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนดังผลการทดลอง เมื่อพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln [C^* - C_L]$ กับเวลา (นาที) และพิจารณาความชันของกราฟ ซึ่งแสดงค่า volumetric oxygen transfer coefficient ($K_L a$) จากการทดลองพบว่า สภาวะการหมุนในแนวอนมีค่า $K_L a$ เท่ากับ $0.0175 \text{ (นาที)}^{-1}$ ส่วนสภาวะเขย่า และสภาวะนิ่งมีค่า $K_L a$ เท่ากับ 0.0381 และ $4 \times 10^{-5} \text{ (นาที)}^{-1}$ ตามลำดับ สำหรับค่า OTR ของสภาวะหมุนในแนวอนมีค่าเท่ากับ 0.1160 มิลลิกรัมของออกซิเจน(ลิตร นาที) $^{-1}$ ส่วนสภาวะเขย่า และสภาวะนิ่งมีค่า OTR เท่ากับ 0.2526 และ 2.65×10^{-4} มิลลิกรัมของออกซิเจน(ลิตร นาที) $^{-1}$ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 39

การเลี้ยงเชื้อในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน มีลักษณะต่างจากสภาวะนิ่งและเขย่าในด้านทิศทางแรงกลที่ให้แก่เพื่อเพิ่มการถ่ายโอนมวลสารโดยเฉพาะออกซิเจน จากการทดลองพบว่าแรงกลของสภาวะการหมักในถังทรงกระบอกแบบหมุน มีผลทำให้การลดลงของค่าการละลายของออกซิเจน เนื่องจากการใช้ของเชื้อ มีค่าน้อยกว่าสภาวะเขย่า และมากกว่าสภาวะนิ่ง โดยในวันที่ศูนย์ สภาวะถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนมีค่าการละลายของออกซิเจนเท่ากับ 3.95 มิลลิกรัมต่อลิตร และลดลงจนเท่ากับ 0 ในวันที่ 4 ดังแสดงในรูปที่ 40

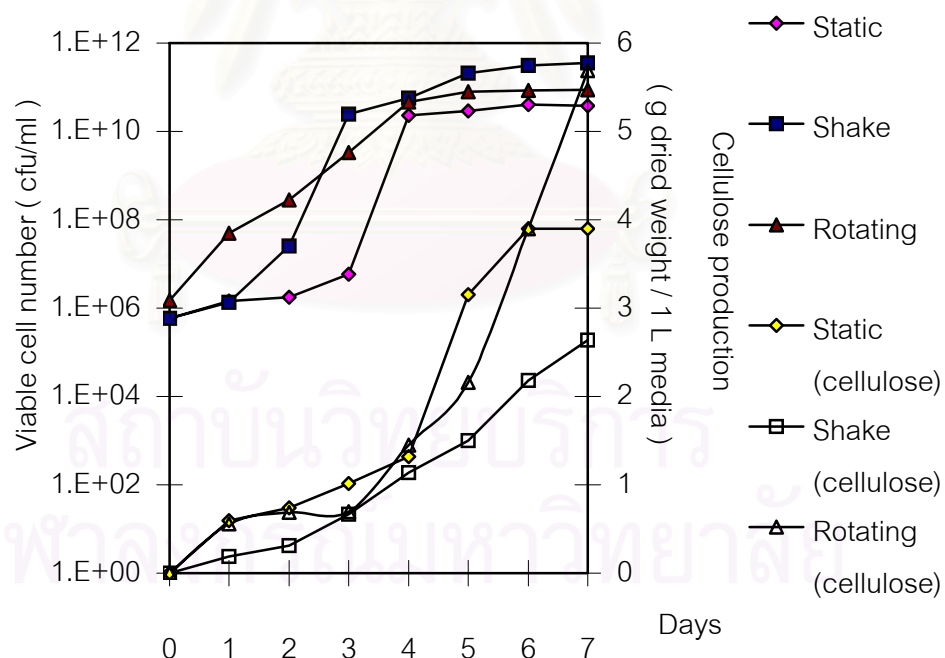


รูปที่ 39 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln [C^*-C_t]$ กับ เวลา (นาที) ของสภาวะนิ่ง เขย่า และ ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน

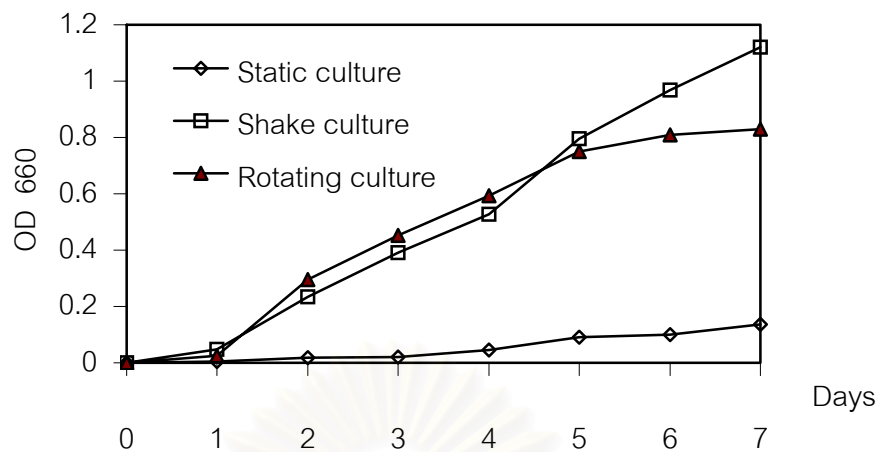


รูปที่ 40 ค่าการละลายของออกซิเจน เมื่อแปรสภาวะการหมัก ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

จะเห็นว่าค่าอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน (รูปที่ 39) ของสภาวะเขย่ามีค่าสูงสุด เป็นผลให้ค่าการละลายออกซิเจนเพิ่มจาก 3.12 มิลลิกรัมต่อลิตรในวันที่ 0 เป็น 7.29 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 และค่อยลดลงเรื่อยๆ และ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell numbers) ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวของ *Acetobacter xylinum* ในสภาวะการหมักทั้ง 3 แบบ พบว่า การเพิ่มจำนวนของเซลล์ของเชื้อในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนจะเริ่มเพิ่มจำนวนเข้าสู่ log phase ตั้งแต่วันแรก ในขณะที่ สภาวะเขย่าและสภาวะนิ่งมี lag phase ตั้งแต่วันที่ 0 ถึง 1 และวันที่ 1 ถึงวันที่ 2 ตามลำดับ และเปรียบเทียบค่า OD ที่ 660 นาโนเมตร พบว่าสภาวะเขย่ามีอัตราการเพิ่มขึ้นของค่า OD มากที่สุด รองลงมาคือ สภาวะการหมุนในแนวนอน และนิ่ง ตามลำดับ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตกับผลผลิตเซลลูโลสในแต่ละวัน พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้น ผลผลิตเซลลูโลสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย โดยในแต่ละสภาวะอัตราการสร้างเซลลูโลสมีมากเมื่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเข้าสู่ stationary phase ซึ่งในสภาวะถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนมีอัตราการผลิตเซลลูโลสสูงกว่าสภาวะนิ่ง และสภาวะเขย่า ดังรูปที่ 41 และ 42

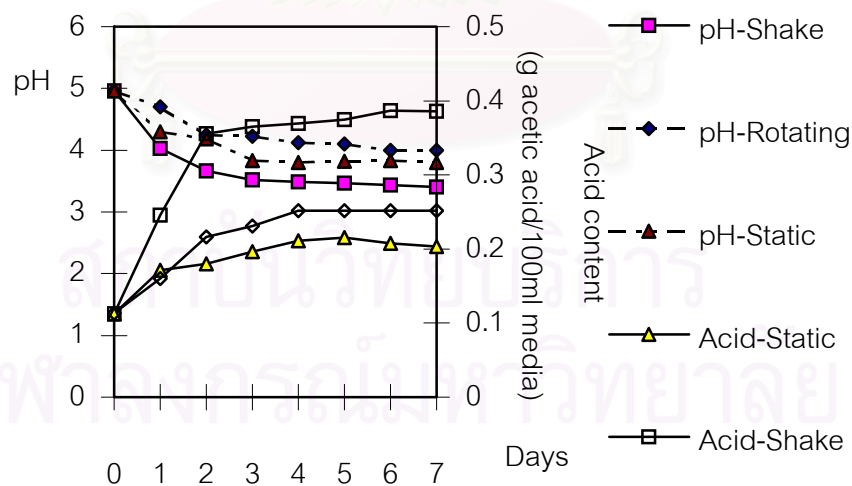


รูปที่ 41 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell numbers) ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว และ ผลผลิตเซลลูโลส (cellulose production) ในสภาวะการหมักที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน



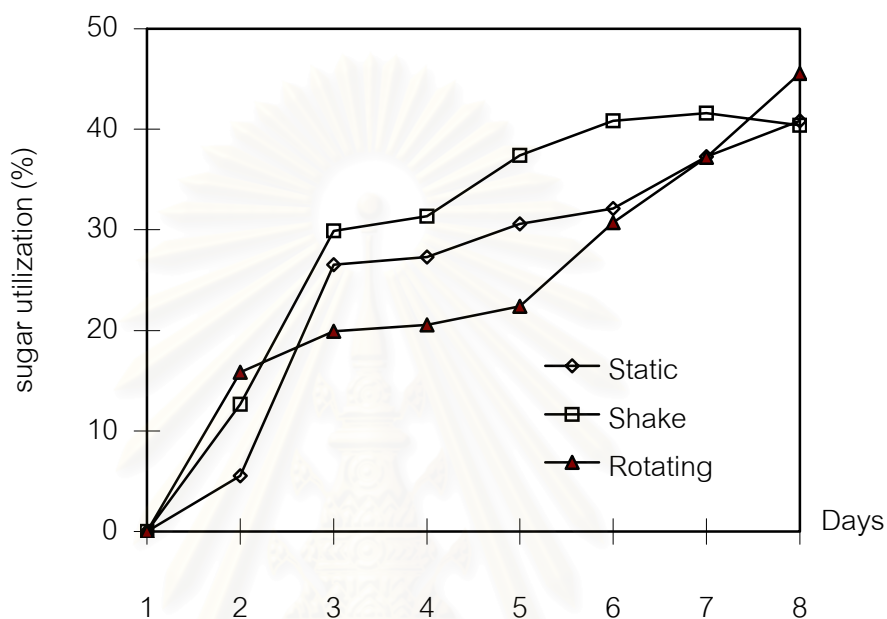
รูปที่ 42 ค่าความขุ่น (Optical density ; OD) ที่ความยาวคลื่น 660 เมื่อเลี้ยง *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในสภาวะถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน นิ่งและเขย่า

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะซิติก (acid content) ที่เชื้อสร้างขึ้นพบว่า สภาวะการหมักในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนมีปริมาณที่ต่ำกว่าสภาวะเขย่า 2 เท่า และสูงกว่าสภาวะผิวนิ่ง 1.6 เท่า สำหรับค่า pH พบว่าสภาวะเขย่ามีอัตราการลดลงของ pH มากที่สุด แสดงในรูปที่ 43



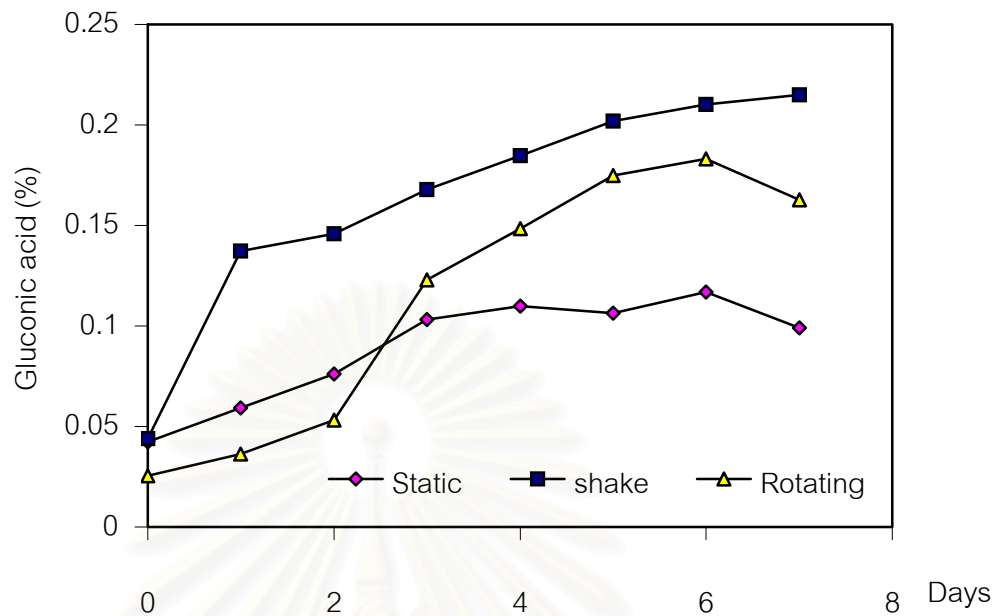
รูปที่ 43 pH และ acid content ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว เมื่อเลี้ยง *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในสภาวะที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

สำหรับการใช้น้ำตาลของเชื้อ พบว่า การใช้น้ำตาลของเชื้อในช่วง 4 วันแรกในสภาวะเขย่า มีอัตราการใช้สูงสุด ในขณะที่สภาวะถึงหมักทรงกระบอกแบบหมุนมีอัตราการใช้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อเข้าสู่วันที่ 4 จนถึงวันที่ 7 มีอัตราการใช้น้ำตาลสูงกว่าสภาวะอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 44



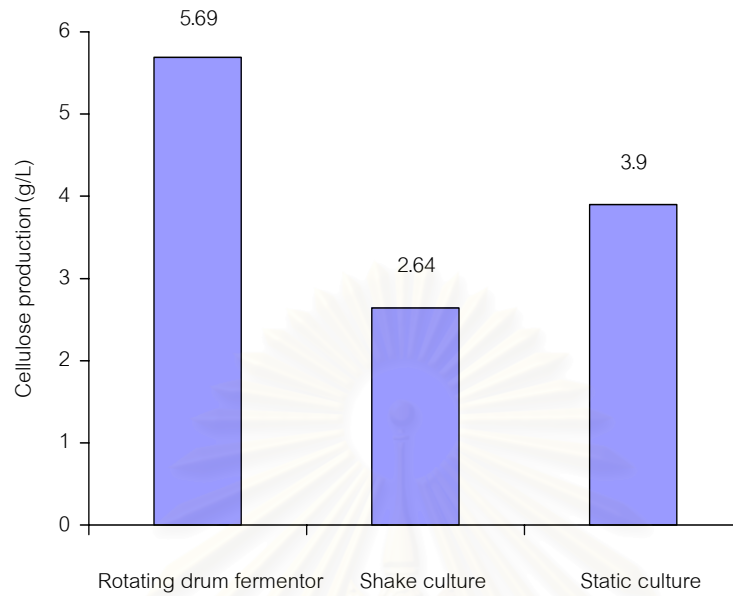
รูปที่ 44 การใช้น้ำตาลของเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในสภาวะที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

ออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ยังส่งผลทำให้เกิดปฏิกิริยา non-phosphorylation oxidation โดยน้ำตาลกลูโคสจะถูกออกซิเดชันโดยเอนไซม์ dehydrogenase เป็นกรดกลูโคนิก ส่งผลทำให้การสร้างเซลล์ลดลงเมื่อปริมาณกรดกลูโคนิกเพิ่มขึ้น จากการทดลองพบว่า อัตราการสร้างกรดกลูโคนิกของเชื้อของสภาวะเขย่าสูงสุด รองลงมาคือ สภาวะในถึงหมักทรงกระบอกแบบหมุนและสภาวะนิ่ง ดังแสดงในรูป 45

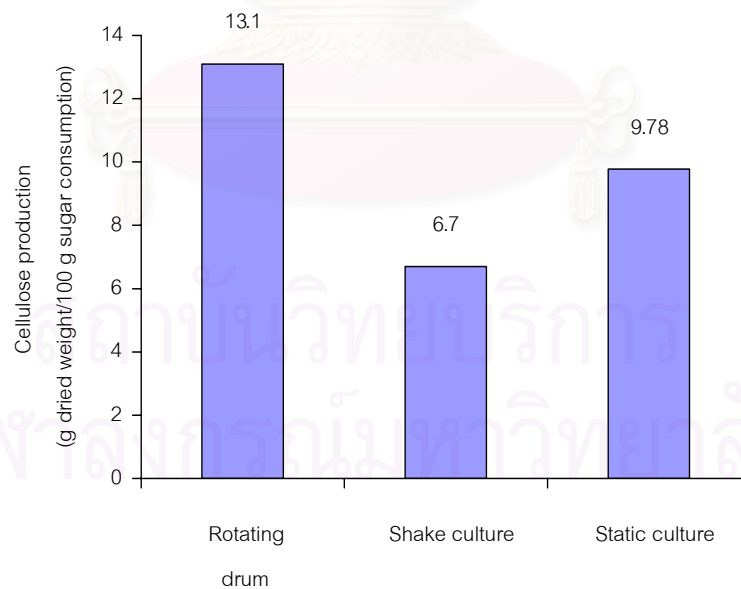


รูปที่ 45 ปริมาณกรดกลูโคนิกที่เชื้อสร้างขึ้น เมื่อสภาวะการหมักต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

การสร้างเซลล์ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนกับสภาวะนิ่ง และเขย่า พบว่า การสร้างเซลล์ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ให้ผลผลิตเซลล์สูงสุดเท่ากับ 5.69 กรัมต่อลิตร (กรัมน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลล์เท่ากับ 13.10 กรัมเซลล์ต่อ 100 กรัม น้ำตาล รองลงมาคือ สภาวะนิ่ง ให้ผลผลิตเซลล์เท่ากับ 3.90 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลล์เท่ากับ 9.78 กรัมเซลล์ต่อ 100 กรัม น้ำตาล และสภาวะเขย่าให้ผลผลิตเซลล์เท่ากับ 2.64 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลล์เท่ากับ 6.70 กรัมเซลล์ต่อ 100 กรัม น้ำตาล ดังแสดงในรูปที่ 46 และ 47



รูปที่ 46 ผลผลิตเซลลูโลส ณ วันที่ 7 ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 เมื่อสภาวะการหมักต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 47 อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลส ณ วันที่ 7 ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 เมื่อสภาวะการหมักต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 ของการผลิตมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพบว่า สภาวะการหมัก ส่งผลให้ค่าต่างๆ เกิดความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ค่าดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อสภาวะการหมักต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

Characteristic	สภาวะ		
	Rotating	Static	Shake
Wet weight (g/100 ml)	36.20 ^a ±2.43	28.29 ^b ±1.38	28.81 ^b ±0.74
Sugar utilization (%) ^{ns}	45.58±2.74	40.87±2.93	40.43±3.21
Acid content (g acetic acid /100 ml media)	0.14 ^b ±0.01	0.10 ^c ±0.01	0.27 ^a ±0.01
Gluconic acid production (%)	0.163 ^b ±0.02	0.099 ^c ±0.06	0.215 ^a ±0.04
Cellulose (g dried weight / 1 l media)	5.69 ^a ±0.18	3.90 ^b ±0.27	2.64 ^c ±0.11
Cellulose production (g / 100 g sugar consumption)	13.10 ^a ±2.16	9.78 ^b ±0.67	6.70 ^c ±0.30

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

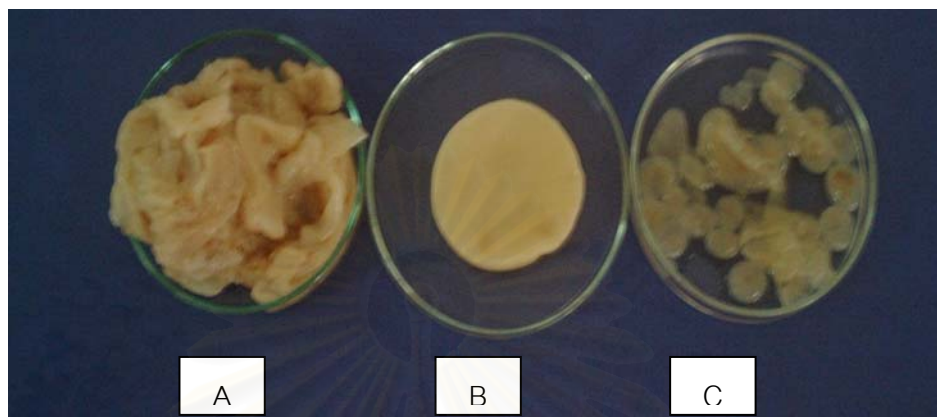
abc อักษรกำกับต่างกันในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 10 จะเห็นว่าการสร้างเซลลูโลสในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนกับสภาวะนิ่งและเขย่าจากการทดลองพบว่า การผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าสภาวะนิ่งและเขย่า เนื่องจากสมบัติของถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนสามารถทำให้เกิดการถ่ายโอนออกซิเจนของระบบได้อย่างเหมาะสมต่อการเจริญและการทำกิจกรรมของเชื้อ โดยเฉพาะบริเวณผนังของถังขณะหมุนขึ้นจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนบริเวณที่จุ่มหรือสัมผัสกับอาหารจะทำให้เชื้อได้รับสารอาหารจากการหมักดังกล่าว (Krystynowicz et al.,2002) ต่างจากสภาวะนิ่งที่การควบคุมการถ่ายโอนออกซิเจนของระบบเป็นไปได้ยาก เนื่องจากแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่เชื้อสร้างขึ้นจะทำให้การถ่ายโอนออกซิเจนระหว่าง

บรรยากาศกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้อย (Dudman , 1960) และแผ่นวุ้นเซลล์ูโลสที่เกิดขึ้นสามารถดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เอาไว้ภายใน ส่งผลต่อการใช้ออกซิเจนของเชื้อลดลง ทำให้ผลผลิตเซลล์ูโลสลดลงด้วย (Schramn and Hestrin , 1954) และในสภาวะเขย่าให้ปริมาณออกซิเจนของการหมักสูงเกินไป (Dudman , 1960 ; อังคณา พันธุ์ศรี , 2540) ทำให้ผลผลิตเซลล์ูโลสต่ำที่สุด เนื่องจากการเขย่า หรือการกวนในระบบ ทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำหมักมีสูง ส่งผลทำให้เชื้อสร้างกรดกลูโคินิกเพิ่มขึ้น (Qazi et al,1993 ; Masaoka et al.,1993 ; Hwang et al.,1999 ; อังคณา พันธุ์ศรี , 2540) จากการทดลองจะเห็นว่า สภาวะเขย่ามีอัตราการลดลงของ pH และอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากกว่าสภาวะอื่น เมื่อพิจารณาจำนวนเซลล์ของเชื้อที่มีชีวิตในน้ำหมักจะเห็นว่า สภาวะการผลิตเซลล์ูโลสในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนเริ่มเข้าสู่ log phase ตั้งแต่วันที่ 1 ในขณะที่สภาวะเขย่ามีการเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่ log phase ในวันที่ 2 และสภาวะนิ่งมีการเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่ log phase ในวันที่ 3 จะเห็นว่าในสภาวะถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนเริ่มเข้าสู่ log phase เร็วกว่า และเมื่อเข้าสู่วันที่ 4 ทั้ง 3 สภาวะเข้าสู่ stationary phase และมีจำนวนเซลล์ของเชื้อที่มีชีวิตในน้ำหมักมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อใน 3 วันแรก จะพบว่าสภาวะในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนมีอัตราการเจริญเติบโตมากกว่าสภาวะนิ่ง 3.5 เท่า และน้อยกว่าสภาวะเขย่า 1.5 เท่า การที่สภาวะเขย่ามีอัตราการเจริญของเชื้อสูงสุดเนื่องจากการเขย่าส่งผลต่อการละลายออกซิเจนมีเพิ่มขึ้น ทำให้การสร้าง ATP content เพิ่มขึ้น ในช่วงวันที่ 2 และมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 3 (Okiyama et al.,1992) และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตกับผลผลิตเซลล์ูโลส ณ วันที่ 4 ถึงวันที่ 7 พบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งสภาวะมีค่าใกล้เคียงกันแต่ผลผลิตเซลล์ูโลสในสภาวะถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนมีอัตราการเพิ่มผลผลิตสูงกว่าสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

สำหรับลักษณะทางกายภาพของวุ้นเซลล์ูโลส พบว่า วุ้นเซลล์ูโลสจากสภาวะถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนมีลักษณะเป็นฟิล์มหนาประมาณ 0.2-0.4 มิลลิเมตร วุ้นเซลล์ูโลสจากสภาวะเขย่ามีลักษณะก้อนกลม หรือ pellet และจากสภาวะนิ่งเป็นแผ่นวุ้น แสดงในรูปที่ 48



รูปที่ 48 ลักษณะทางกายภาพของวุ้นเซลลูโลส

(A : สภาวะกึ่งหมักทรงกระบอกแบบหมุน B: สภาวะนิ่ง C : สภาวะเขย่า)

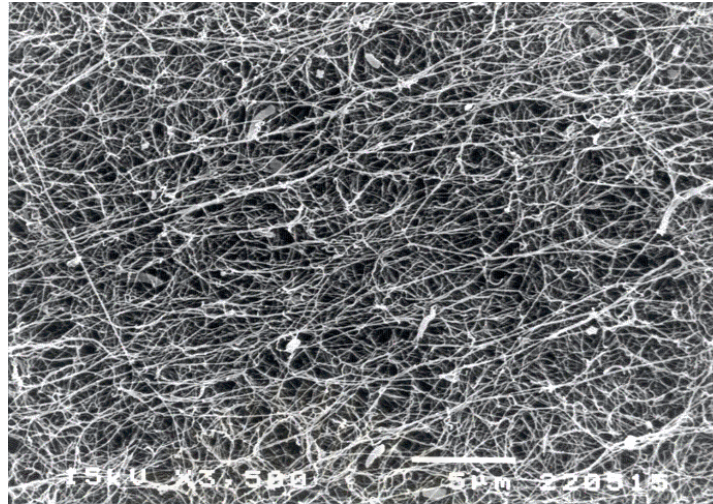
สำหรับการศึกษาลักษณะโครงสร้างของร่างแหของเซลลูโลสโดยภาพถ่าย จากการส่องด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) (รูปที่ 49 และ 50) แสดงให้เห็นความแตกต่างของร่างแหเซลลูโลสในแง่ ความหนาแน่น ขนาดโพรง ขนาดเซลล์ และขนาดเส้นใย จากการทดลองที่กำลังขยาย 3,500 เท่า พบว่า เส้นใยจากสภาวะนิ่งมีความหนาแน่นที่สุด เนื่องจากความหนาแน่นของเส้นใยจะแปรผกผันกับขนาดโพรง (ธัญญารัตน์ พงศ์ทรงกูร, 2543) ส่วนขนาดของโพรงแผ่นวุ้นเซลลูโลสจากสภาวะการหมักในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนมีขนาดใหญ่กว่าขนาดโพรงในแผ่นวุ้นเซลลูโลสจากสภาวะนิ่ง และมีขนาดใกล้เคียงแผ่นวุ้นเซลลูโลสจากสภาวะเขย่า และที่กำลังขยาย 35,000 เท่า พบว่า ขนาดของเส้นใยเซลลูโลสจากสภาวะการหมักในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนมีขนาดใหญ่ที่สุดเท่ากับ 80 ไมโครเมตร รองลงมาคือ เส้นใยจากสภาวะนิ่ง และเขย่า มีขนาดเท่ากับ 72 และ 67 ไมโครเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 10 และ การกระจายของขนาดรูโพรงในร่างแหวุ้นเซลลูโลสพบว่าทั้ง 3 สภาวะมีค่าการกระจายของขนาดโพรงอยู่ในช่วง 0.5-0.9 ไมครอน มากที่สุด ดังรูปที่ 5

ตารางที่ 11 ขนาดโพรง ขนาดเซลล์ และขนาดเส้นใยเซลล์จากสภาวะการหมักต่างๆ
ณ วันที่ 7

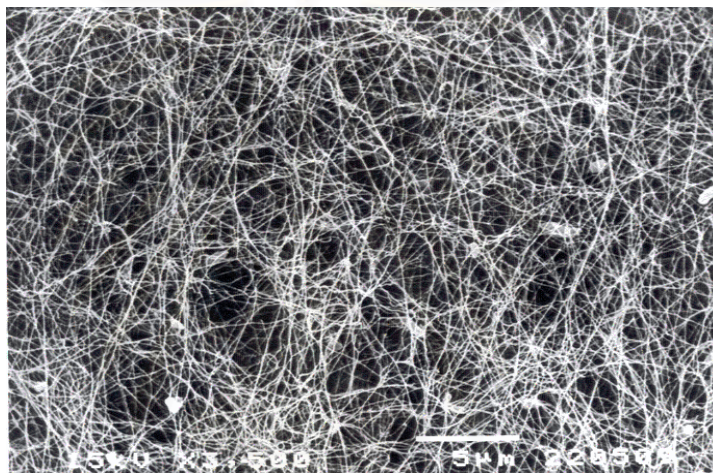
Characteristic	สภาวะ		
	Rotating	Shake	Static
ความกว้างของเซลล์ (ไมโครเมตร)	~0.35	~0.44	~0.60
ความยาวของเซลล์ (ไมโครเมตร)	~1.68	~1.85	~1.63
ขนาดเส้นใย (นาโนเมตร)	~80	~67	~72
ขนาดโพรง (ไมโครเมตร) n=60	~1.03 max 2.96 min 0.37	~0.73 max 2.28 min 0.35	~0.61 max 1.13 min 0.29

ขนาดของเส้นใยเซลล์ที่สร้างจาก *Acetobacter xylinum* นั้นโดยปกติจะมีความกว้างอยู่ในช่วง 60-80 นาโนเมตร (Brown et al.1976 ; Zarr, 1977) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ สำหรับขนาดโพรงของร่างแหเส้นใยเซลล์ มีผลต่อการเก็บกักน้ำของแผ่นวุ้นเซลล์ โดยขนาดโพรงที่ใหญ่จะมีความสามารถในการเก็บกักน้ำได้มาก (ธัญญรัตน์ พงศ์ทรงกูร, 2543) จากการศึกษาการ syneresis ของวุ้นเซลล์จากสภาวะการหมักทั้ง 3 พบว่าอัตราการ syneresis ของวุ้นเซลล์จากสภาวะถึงหมักทรงกระบอกแบบหมุนมี อัตราการ syneresis น้อยกว่าสภาวะเขย่า แต่มากกว่าสภาวะนิ่ง ผลดังแสดงในรูปที่ 52

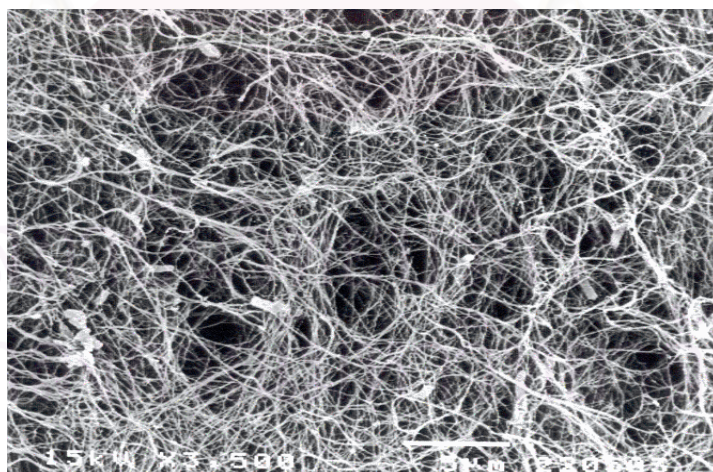
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(A)

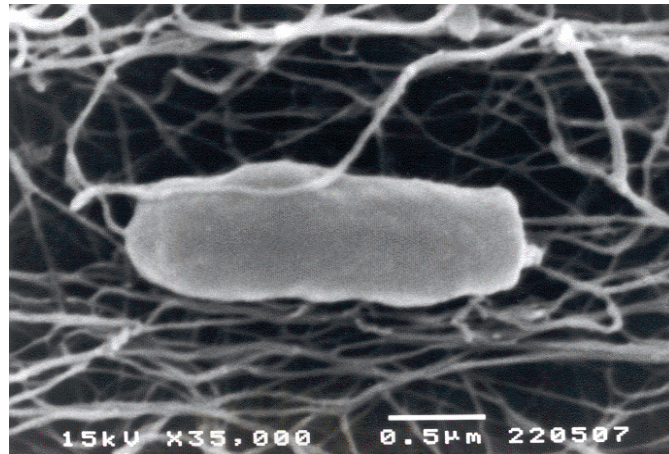


(B)

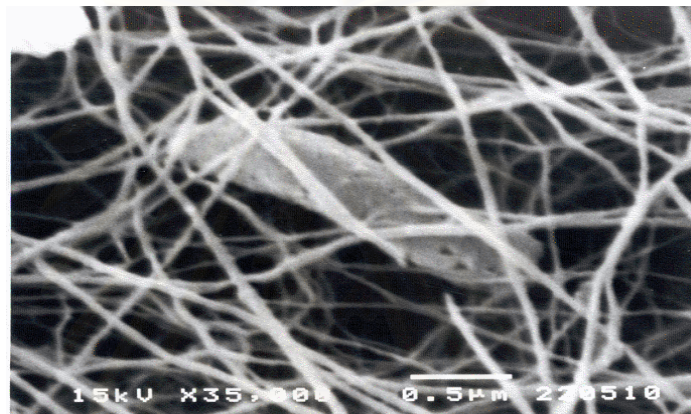


(C)

รูปที่ 49 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่สร้างจาก *A. xylinum* sp. TISTR 975 แสดงขนาดโพรง และเส้นใยเซลลูโลส เมื่อแปรรูปภาวะการหมัก A : Static culture B: Shake culture และ C : Rotating culture กำลังขยาย 3,500 เท่า



(A)

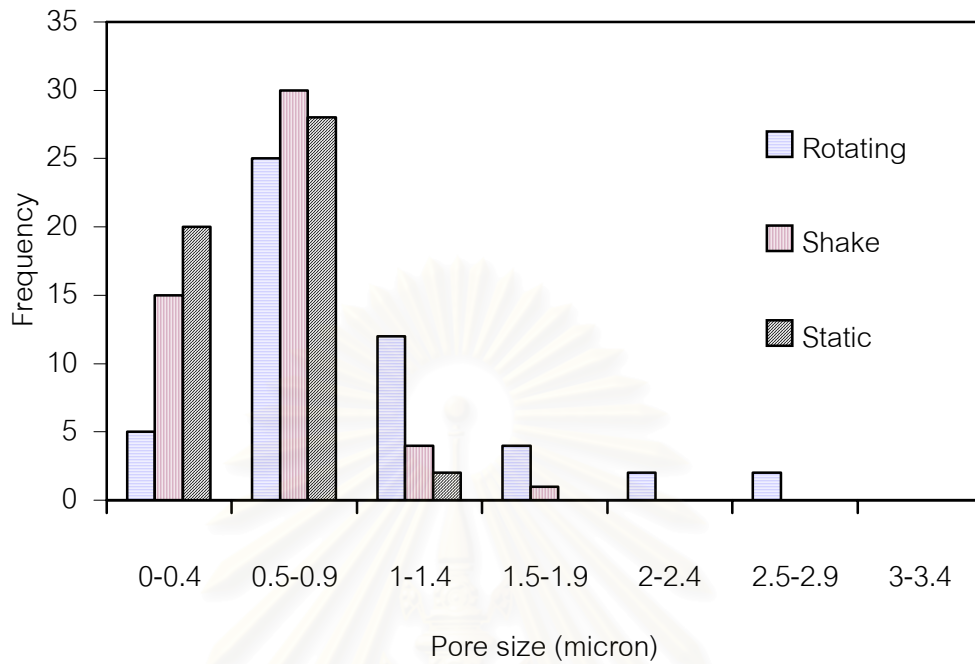


(B)

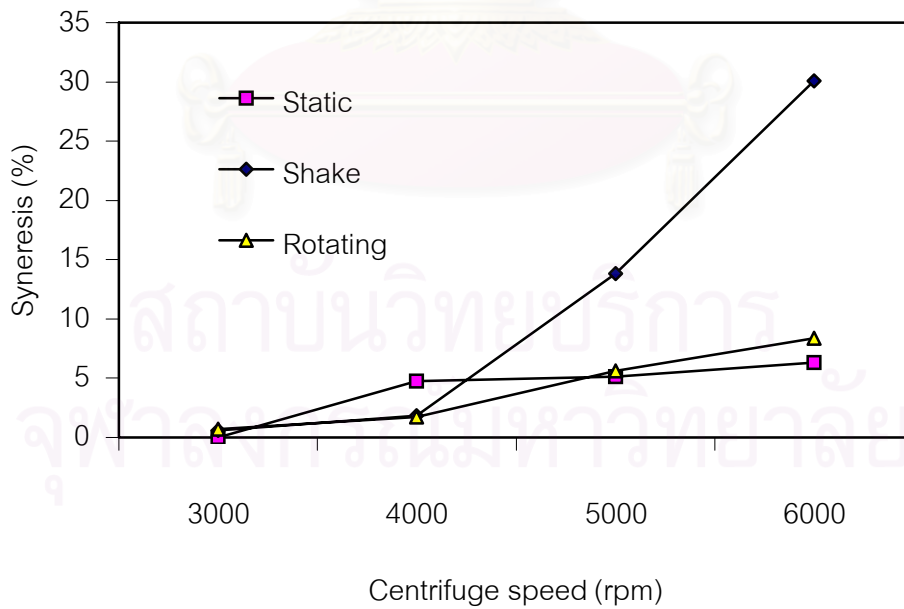


(C)

รูปที่ 50 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงขนาดเซลล์ ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 เมื่อแปรรูปภาวะการหมัก A : Static culture B: Shake culture และ C : Rotating culture กำลังขยาย 35,000 เท่า



รูปที่ 51 การกระจายของขนาดรูโพรงในร่างแหหุ่นเซลล์โลสจากสภาวะการหมักต่างกัน



รูปที่ 52 syneresis ของหุ่นเซลล์โลสที่ได้จากหมักในในสภาวะตั้งหมักทรงกระบอกแบบ หมุน สภาวะนิ่ง และเขย่า

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. ความเร็วในการหมุนถังเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ค่าอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนเพิ่มขึ้นด้วย
2. ความเร็วในการหมุนถังเท่ากับ 5 รอบต่อนาที ให้ผลผลิตเซลล์ไลสสูงสุด และเมื่อความเร็วมากกว่า 5 รอบต่อนาที การเจริญและการใช้น้ำตาลของเชื้อเพื่อสร้างกรดจะมีมากขึ้น ทำให้ผลผลิตเซลล์ไลสลดลง
3. ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10 % ให้ผลผลิตเซลล์ไลสสูงสุดและเมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากกว่า 10 % การเจริญและการใช้น้ำตาลของเชื้อเพื่อสร้างกรดจะเพิ่มขึ้น และทำให้ผลผลิตเซลล์ไลสลดลง
4. ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1.5 ลิตร ให้ผลผลิตเซลล์ไลสสูงสุด
5. อัตราส่วน C:N เท่ากับ 0.25 ให้ผลผลิตเซลล์ไลสสูงสุด อัตราส่วน C:N ที่ลดลงมีผลให้ปริมาณการใช้น้ำตาล และการสร้างกรดเพิ่มขึ้น
6. การสร้างเซลล์ไลสของเชื้อในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนให้ผลผลิตเซลล์ไลสสูงสุด รองลงมาคือ สภาวะนิ่ง และเขย่า ตามลำดับ ปริมาณกรดอะซิติกในสภาวะหมักทรงกระบอกแบบหมุน มีต่ำกว่าสภาวะเขย่า 2 เท่า และสูงกว่าสภาวะนิ่ง 1.6 เท่า เซลล์ไลสจากสภาวะถังหมักหมักทรงกระบอกแบบหมุนมีขนาดเส้นใยเซลล์ไลส และขนาดโพรงในโครงสร้างใหญ่กว่าเซลล์ไลสที่ได้จากสภาวะนิ่งและเขย่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาผลของทิศทางแรงกลในแต่ละสภาวะต่อภาวะแปรผันของเชื้อ และการสร้างเซลล์ไลสของเชื้อ
2. ควรศึกษาผลของลักษณะ และขนาดตะแกรงลวดที่ใส่เพิ่มในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน เนื่องจากเชื้อสามารถยึดเกาะกับผนังถังได้ ป้องกันการ collapse ของแผ่นวุ้นเซลล์ไลส
3. การผลิตเซลล์ไลสโดยใช้ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนที่ทำจากสแตนเลส ต้นทุนสูง เนื่องจากราคาวัสดุที่แพง ดังนั้นควรเลือกวัสดุที่ราคาถูกและเหมาะสมต่อการการผลิต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ธัญญารัตน์ พงศ์พรางกู. 2541. ผลของภาวะการเลี้ยง Acetobacter สายพันธุ์ Agr 60 และ TISTR 975 ต่อสมบัติทางกายภาพของแผ่นวุ้นเซลล์ูโลส. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วรารุณี ครูส่ง , กรวิกา สุขศรีวงษ์ และปนัดดา พวงเกษม. 2536. การผลิตเซลล์ูโลสจาก *Acetobacter xylinum* ในน้ำหางนม. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง 11 (1) : 47-54.
- วรารุณี ครูส่ง, นฤมล ชูวัฒนเดชะ , เชิดชัย ตั้งอมรสุขสันต์ และอินทิรา ปรุงเลิศบัวทอง. 2535. การผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าว. วารสารเกษตรศาสตร์พระจอมเกล้า 10 (4) : 46-60.
- สมคิด ธรรมรัตน์. 2531. การผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวและการแปรรูป . อาหาร 18 (4) : 250-262.
- สมศรี ลีปีพัฒนวิทย์. 2531. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับทำวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าวแก่. อาหาร 18 (4) : 239-249.
- อังคณา พันธุ์ศรี. 2541. ผลของออกซิเจนและสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างเซลล์ูโลสของแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- AOAC. 1990. Official Method of Analysis Vol 2, 15th ed. Association Of Official Analytical Chemist.
- Alaban, A. C. 1962. Studies on the optimum conditions for Nata De Coco bacterium or Nata formation in coconut water . The Philippine Agriculturerist 45 : 490-496.
- Asai, T. 1968. Acetic Acid Bacteria Classification and Biochemistry Activities. Tokyo : Tokyo Press.
- Breed, R.S., Murray, E.G.D., and Smith, N.R. 1957. Burgey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th ed. Baltimore : Williams and Wilkins.

- Brown, R.M., Jr., Willison, J.H.M., and Richardson, C.L. 1976. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum* : Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73 (12) : 4565-4569.
- Brown, R. M. 2002. Microbial cellulose : A new resource for wood, paper, textiles, food, and specialty products. Position Paper [on line] Available from : <http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/position1.html> [July 8, 2002]
- Budniono , A. 1999. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. Carbohydrate Polymer. 40 : 137-143.
- Cardona, T.D. 1994. Nata De Coco production as affected by carbon source and nitrogen. A special study report submitted to doctoral program committee. Agricultural and food engineering program. Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand.
- Chao, Y., Ishida, T., Sugano, Y., and Shoda, M. 2000. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50 L internal loop airlift reactor . Biotechnology and Bioengineering 68 (3) : 345-352.
- Coeffy , D.G., and Bell , D.A. 1995. Cellulose and cellulose derivatives cited in Stephen, A. M. 1995. Food Polysaccharide and their application. New York : Dekker.
- Dimaguilla, L.A. 1976. The Nata de coco 2. Chemical nature and properties of Nata. The Philippine Agriculturerist 40 : 475-485.
- Dolendo, A.L., and Maniquis, P.L. 1976. Preparation and storage qualities of fortified nata de coco . The Philippine Journal of Science 46 : 363-375. อ้างใน สมศรี ลีพัฒน์วิทย์. 2531. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับทำวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าวแก่. อาหาร 18 (4) : 239-249.
- Dubois, M. 1956. Colormetric method for determination of sugars and related substance. Analytical Chemistry 28: 350-356.
- Dudman, W. F. 1959. Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* in define midium. Journal of General Microbiology 21 : 327-337.

- Dudman, W. F. 1960. Cellulose production by *Acetobacter* strains in submerged culture. Journal of General Microbiology 22 : 25-30.
- Ebner, H. 1982. Vinegar. In G. Reed (ed). Proscott and Dunn's Industrial Microbiology. 4th. Reed AVI Publishing Com., Inc. Wesport, Connecticut.
- Furda, I. 1977. Fractionation and Examination of Biopolymer from Dietary Fiber. Cereal Foods World 22 (6) : 252-254.
- Guzman, M.P., Alabastro, E.F., and Tinsay, C.B. 1982. A submerged process for the production of Nata. NRCP Research Bull. 37 (7) : 1-50.
- Hideo, T., Fuyuhiko, N., Mitsuru, S., and Tetsuyu, I. 1983. Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures. Biotechnology and Bioengineering 25 : 2359-2370.
- Hirai, A., and Horii, F. 1999. Cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum*. ICR Annual Report 6 : 28-29.
- Hwang, J. W., Yang, Y.K., Hwang, J.K., Pyun, Y.R., and Kim, Y.S. 1999. Effects of dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. Journal of Bioscience and Bioengineering 88 (2) : 183-188.
- Ishikawa, A., Tsuchida, T., and Yoshinaga, F. 1998. Relationship sulfaguanidine resistance and increased cellulose production in *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans* BPR3001E. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 62 (2) : 1234-1236.
- Jonas, R., and Farah, L.F. 1998. Production and application of microbial cellulose. Polymer Degradation and Stability 59 : 101-106.
- Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H., and Yoshinaga, F. 1998. Inhibitory effect of carbon dioxide on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in agitated culture. Journal of Fermentation and Bioengineering 85 (3) : 318-321.
- Kouda, T., Hisato, Y., Fumihiko, Y., and Hisato, Y. 1997. Effect of oxygen and carbon dioxide pressure on cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated culture. Journal of Fermentation and Bioengineering 84 (2) : 124-127.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Jeziernska, A.W., Miskiewicz, M.G., Turkiewicz, M., and Bielecki, S. 2002. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 29 : 189-195.

- Lapuz, M.M., Gallardo, E.G., and Palo, M.A. 1967. The Nata organism-culture requirements characteristic and identity. The Philippine Journal of Science 96 : 91-109.
- Lucca, P.A., and Tepper, B.J. 1994. Fat replacer and the functionality of fat in foods. Trends in Food Science and Technology 5 : 12-19.
- Lund, E.D. ,and Smoot, J. M. 1982. Dietary fiber content of some tropical fruit and vegetables. Journal of Agriculture and Food Chemistry 30 : 1123-1127.
- Matsushita, K., Toyama, H., and Adachi, O. 1994. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. Advance Microbiology and Physiology 36 : 247-301.
- Masaoka, S.,Ohe, T. ,and Sakota, N. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum* .Journal of Fermentation and Bioengineering 75 (1) : 18-22.
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H. , and Yoshinaga, F. 1998. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. Journal of Fermentation and Bioengineering. 85(1) : 89-95.
- Oikawa, T., Kamatani, T., Kaimura, T., Ameyama, A., and Soda, K. 1997. Endo- β -glucanase from *Acetobacter xylinum* : purification and characterization. Current Microbiology 34 : 309-313.
- Okiyama, A., Shirae, H., Kano, H.,and Yamanaka, S. 1992. Bacterial cellulose I .Two stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*. Food Hydrocolloid 6 (5) : 471-477.
- Phunsri, A., Tammarate, P., Krusong, W., and Tantratian, S. 2003. The liquid/air interface area and depth of liquid medium suitable for cellulose production from *Acetobacter* sp. TISTR 975 . Journal of Science Research Chulalongkorn University 28 (1) : 35-43.
- Qazi,N.Q., Sharma,N., and Parshad,R. 1993. Role of dissolved oxygen as a regulator for the direct oxidation of glucose by *Erwinia herbicola* and *Gluconobacter oxydans*. Journal of Fermentation and Bioengineering 76 (4) : 336-339.
- Reu, J.C., Griffith, A. M., Rombouts, F.M., and Nout, M.J.R. 1995. Effect of oxygen and carbon dioxide on germination and growth of *Rhizopus oligisporus* on model media and soybeans. Applied Microbiological and Biotechnology 43 : 908-913.

- Roberts, E.M., Saxena, I. M., and Brown, R.M. 1989. Biosynthesis of cellulose II in *Acetobacter xylinum*. cited in Schuerch, C. (editor). Cellulose and Wood Chemistry and Technology. New York : John Willey & Sons.
- Ross, P. , Raphael, M. , and Moshe, B. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Journal of Microbiological Review 55 : 35-58.
- Saxena, I. M., and Brown, R.M. 1997. Identification of cellulose synthase (s) in higher plant sequence analysis of processive β -glycosyltransferase with the common motif " D,D,D,35Q(R,Q)XRW" . Cellulose 4 [online] Available from : <http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/position1.html> [November 27, 2002]
- Saxena, I.M., Dandekar, T.,and Brown, R. M. 2002. Mechanisms in cellulose biosynthesis [on line] Available from : <http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/position1.html> [July 8, 2002]
- Schramn, M., and Hestrin, S. 1954. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum* . Journal of General Microbiology 11 : 123-129.
- Scragg, A.H. 1991. Bioreactors in Biotechnology : A practical approach. New York : Ellis Horwood.
- Serafica, G., Mormino, R., and Bungay, H. 2002. Inclusion of solid particles in bacterial cellulose. Applied Microbiology and Biotechnology [on line] Available from E-mail : Bungah@rpi.edu
- Shibazaki, H., Kugo, S., Onabe, F., and Usuda, M. 1993. Bacterial cellulose as separation medium. Journal of Applied Polymer Science 50 : 965-969.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., and Hall, S.J. 1995. Principle of Fermentation Technology. Oxford :Pergamon Press.
- Tammarate, P. 1999. Process for modification and utilization of bacterial cellulose. US Patent 5,962,676.

- Tanaka , H., Nishijima , F., Suwa ,M., and Iwamoto, T. 1983. Rotating drum fermentor for plant cell suspension Cultures. Biotechnology and Bioengineering 25 : 2359-2370.
- Tonouchi, N., Horinouchi, S., Tsuchida, T., and Yoshinaga, F. 1998. Increase cellulose production from sucrose by *Acetobacter* after introducing the sucrose phosphorylase gene. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 62 (9) : 1778-1780.
- Tonouchi, N., Tahara, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T., and Horinouchi, S. 1998. Addition of small amount of an endoglucanase enhances cellulose production by *Acetobacter xylinum* . Bioscience Biotechnology and Biochemistry 59 (5) : 805-808.
- Townsley, P.M. 1998. Method for the producing cellulosic fibers and microcrystalline cellulose. US Patent no.4,745,058.
- Toyosaki , H., Naritomi , T., Seto, A., Tsuchida,T., and Yoshinaga, F. 1995. Screening of bacterial cellulose-producing strains suitable for agitated culture. Bioscience Biotechnology Biochemistry 59 (8) : 1498-1502.
- Valla, S. 1995. Food Biotechnology : Microorganism for cellulose production. New York : VCH Publisher Inc.
- Watanabe, K. , and Yamanaka, S. 1995. Effect of oxygen in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture conditions. Bioscience Biotechnology Biochemistry 59 (1) : 65-68.
- White, D. G., and Brown, R.M. 1989. Prospect for commercialization of the biosynthesis of microbial cellulose . cited in Schuerch, C. (editor). Cellulose and Wood Chemistry and Technology. New York : John Willey & Sons.
- White, D. 1995. The Physiology and Biochemistry of Procaryotes. 2nd edition. Oxford University Press : New York.
- Whitfield, C. 1988. Bacterial extracellular polysaccharide of bacteria. Bacteriology Review 22 : 46-73.

Yoshinaga, F., Tonouchi, N., and Wanatabe, K. 1997. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. Bioscience Biotechnology Biochemistry 61 (2) : 219-224.

Zarr, K. 1977. Cytobiologie 16 : 1-15 cited in Yoshinaga, F., Tonouchi, N., and Wanatabe, K. 1997. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. Bioscience Biotechnology Biochemistry 61 (2) : 219-224.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR 975

1.1 สูตรอาหารน้ำมะพร้าวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (starter)

น้ำมะพร้าวแก่กรอง ต้มให้เดือดช้อนไขมันออก	1	ลิตร
แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
น้ำตาลทราย	50	กรัม
ความเป็นกรด-ด่าง	4.75	

1.2 สูตรอาหารน้ำมะพร้าวสำหรับหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต

น้ำมะพร้าวแก่กรอง ต้มให้เดือดช้อนไขมันออก	1	ลิตร
แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
น้ำตาลทราย	50	กรัม
ความเป็นกรด-ด่าง	4.75	
วุ้นผง	1.5	กรัม

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดโดยใช้มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

2. วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก (A.O.A.C, 1990)

- สารเคมี
1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล
 2. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน

วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่
2. หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด
3. ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู
4. การคำนวณ

ปริมาณความเป็นกรดทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ $\frac{MW \times N \times V \times 100}{10 \times 1000}$

เมื่อ MW คือ มวลโมเลกุลของกรดอะซิติกมีค่าเท่ากับ 60.05 กรัมต่อโมล

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรต

V คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรต

3. วิธีวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell numbers)

เตรียมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำมาเจือจางน้ำหมักกระจายแบคทีเรียบนอาหารน้ำมะพร้าว ตามภาคผนวก ก. ข้อ 1.2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วง 30 – 300 โคโลนี

4. วิธีวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส (cellulose content) (Watanabe and Yamanaka, 1995)

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์
2. สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

วิธีการ

1. นำแผ่นเซลลูโลสล้างน้ำสะอาด แล้วแช่น้ำ 1 คืน
2. ฝั่งให้สะเด็ดน้ำ 1 ชั่วโมง แล้วไปต้มใน สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที
3. ล้างน้ำสะอาด แช่ไว้ 1 คืน
4. แช่กรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมง
5. ล้างด้วยน้ำสะอาด
6. นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่

5. วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูโคนิก (gluconic acid)

สารเคมี กรดฟอสฟอริก 20 mM pH 2.5

วิธีการ

นำน้ำหมักมารองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5 แล้วนำน้ำใสไปตรวจสอบปริมาณกรดด้วย HPLC (Shimudzu LC-3A) โดยมีภาวะดังนี้

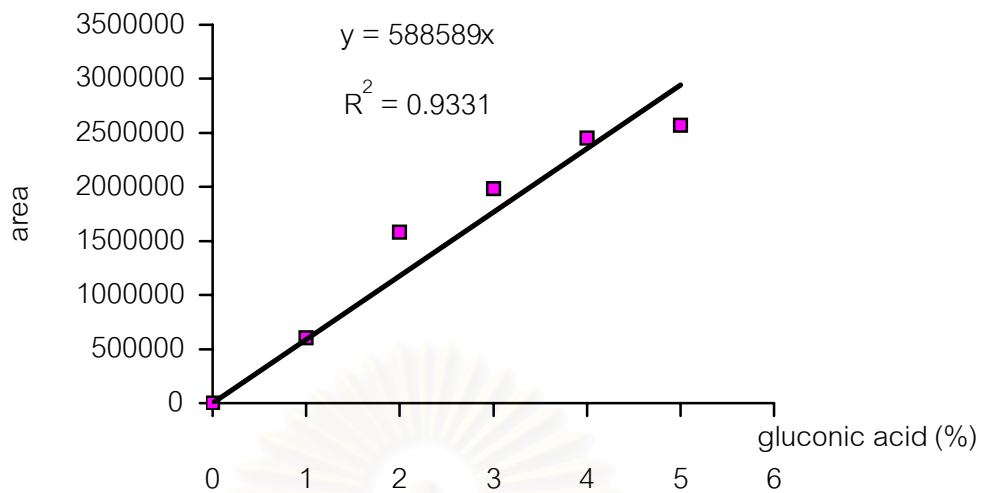
คอลัมน์ : Zorbox – C8 (L-3555) ขนาด 25 เซนติเมตร x 4.6 มิลลิเมตร ของบริษัท Dupont

สารละลายตัวพา : 20 mM ของกรดฟอสฟอริก pH 2.5

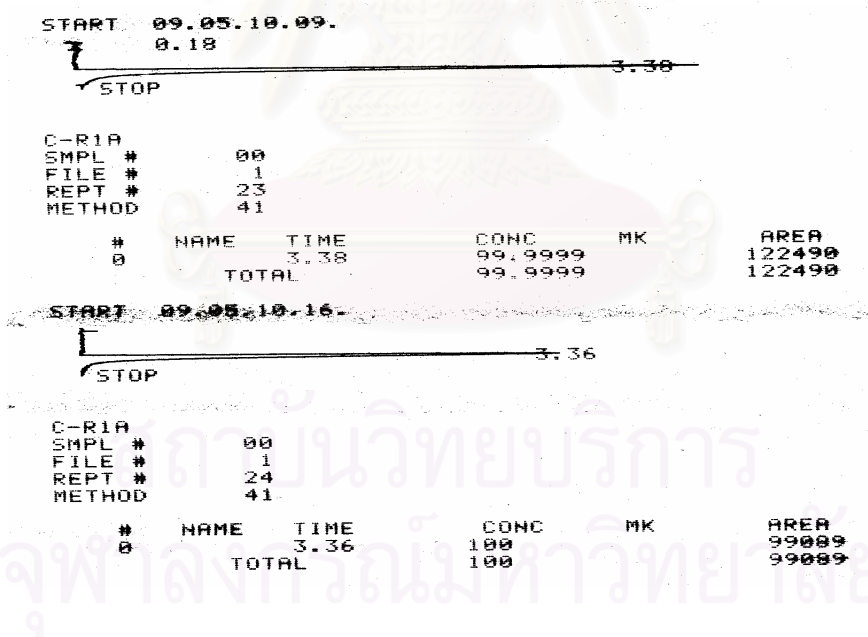
อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

อุณหภูมิคอลัมน์ : อุณหภูมิห้อง

เครื่องตรวจวัด : คลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV-Detector) ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานกรดกลูโคนิก



รูปที่ ข.2 โคโรมาโตแกรมของกรดกลูโคนิก

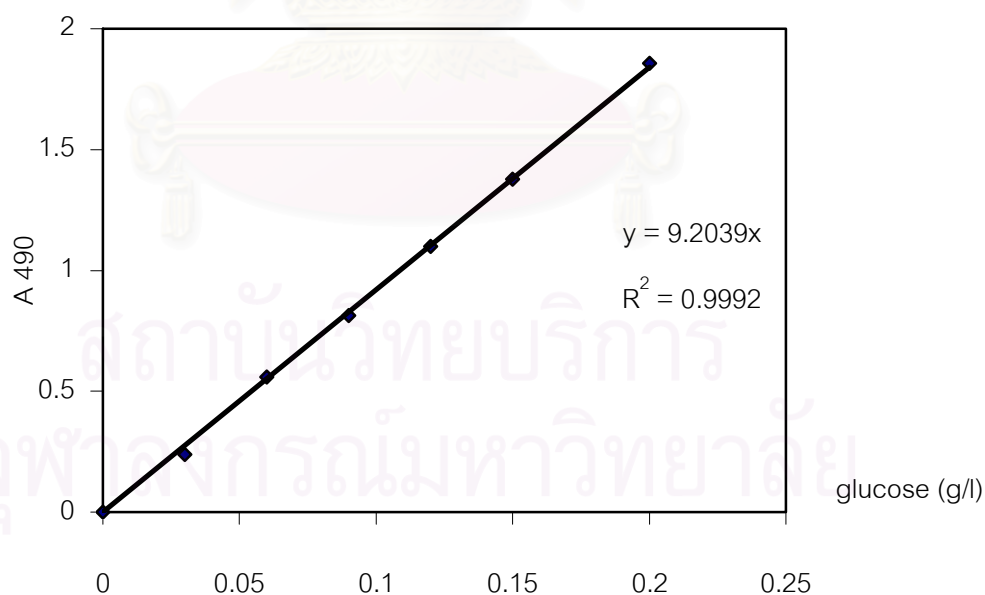
6. วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) (Dobois et al., 1956)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารละลายฟีนอล 5 %

วิธีการ

1. ตูตสารละลายตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 5-100 กรัมต่อลิตร)
2. เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 % 1 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว
4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
6. การคำนวณ
น้ำตาลทั้งหมด (g/L) เท่ากับ $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร} \times \text{อัตรากราฟเชิงฉาก}}{\text{ความชันของกราฟ}}$



รูปที่ ๓.3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

7. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (dissolved oxygen)

วัดโดยใช้วัดมาตรวัดออกซิเจนที่ละลาย (Portable oxygen meter)

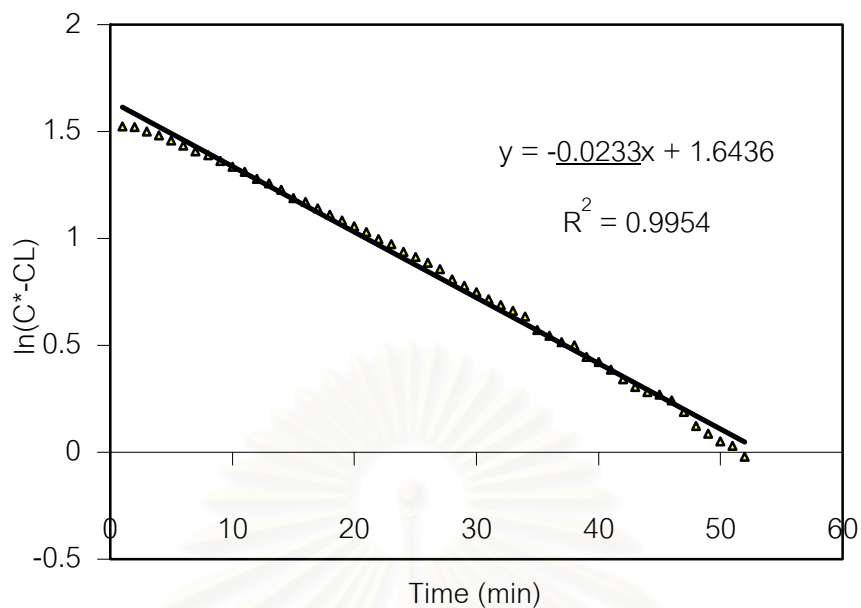
8. วิธีวัดค่าอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน (oxygen transfer rate) โดยวิธี static gassing out method (Stanbury et al.,1995)

สารเคมี : ก๊าซไนโตรเจน เกรดอุตสาหกรรม

วิธีการ

1. บรรจุอาหารเหลวในหม้อปั่นในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน หรือ ขวดแก้วขนาด 8 ลิตร
2. ฟันก๊าซไนโตรเจนลงในอาหารเหลวในหม้อปั่นจนค่าการละลายออกซิเจนเท่ากับศูนย์
3. หยุดการให้ก๊าซไนโตรเจนแก่ระบบ จากนั้นเริ่มจับเวลาไปพร้อมกับการให้แรงกลแก่ระบบ จดบันทึกค่าการละลายของออกซิเจน (C_L) ที่เพิ่มขึ้นทุก 1 นาที จนกระทั่งค่าการละลายดังกล่าวคงที่ (C^*)
4. คำนวณค่า $\ln [C^*-C_L]$ จากนั้นพลอตกราฟแสดงความระหว่างค่า $\ln [C^*-C_L]$ กับเวลา (นาที)
5. ค่าความชันของกราฟมีค่าเท่ากับลบค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจน (volumetric oxygen transfer coefficient , $K_L a$)
6. คำนวณค่าอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน (oxygen transfer rate ,OTR) = $C^* K_L a$ มีหน่วยเป็น $mgO_2/l.min.$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูป ข.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln [C^*-C_L]$ กับเวลา ค่าความชันเท่ากับ $-K_L a$

9. วิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) (AOAC, 1995)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. กรดบอริกความเข้มข้น 4 %
3. กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.01 นอร์มัล
4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 35 เปอร์เซ็นต์
5. เซเลเนียม คะตะลิส
6. อินดิเคเตอร์ผสมระหว่าง Bromo cresol green กับ Methyl red

วิธีการ

1. ปิเปตตัวอย่าง 4 มิลลิลิตรลงใน digestion vessels
2. เติมเซเลเนียม คะตะลิส 5 กรัม กรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร และ glass beads
3. นำ digestion vessels ตั้งในชุดย่อยจนได้สารละลายสีฟ้า ทิ้งให้เย็น
4. นำไปทำการกลั่นในเครื่องกลั่นโปรตีน เติมน้ำกลั่นให้ได้ 80 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 35 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร ทำการกลั่นโดยตั้งเวลา 5 นาที

เก็บก๊าซแอมโมเนียในสารละลายกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร ที่มีอินดิเคเตอร์
ผสมอยู่

5. นำส่วนที่กลั่นได้ไปไตเตรตกับสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.01 นอร์มัล จนกระทั่ง
สารละลายสีเขียวเปลี่ยนเป็นสารละลายใส

6. การคำนวณ

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ (ความเข้มข้นกรดซัลฟูริกที่ใช้ไต
เตรต x ปริมาตรกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรต x 14 x 100) / (ปริมาตรตัวอย่าง)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ค.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าน้ำหนักเปียก ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณกรดกลูโคนิก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ผลผลิตเซลลูโลสต่อ 100 กรัม น้ำตาลที่ใช้ และผลผลิตเซลลูโลสต่อปริมาตรอาหารเหลว น้ำมะพร้าว 1 ลิตร ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 เมื่อแปรความเร็วจนจบในการหมักจนถึงหมักทรงกระบอกแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

SOV	df	MS					
		Wet weight	Acidity	Gluconic acid	Sugar utilization	Cellulose production (g/100 g sugar consumption)	Cellulose production (g/100 100 ml media)
Treatment	2	13132.60*	4.69E ⁻⁰² *	1.56E ⁻⁰³ *	18.91	25.42*	5.33*
Error	6	555.831	6.00E ⁻⁰⁴	3.07E ⁻⁰⁵	6.49	2.62	0.14

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ค.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าน้ำหนักเปียก ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณกรดกลูโคนิก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ผลผลิตเซลลูโลสต่อ 100 กรัม น้ำตาลที่ใช้ และผลผลิตเซลลูโลสต่อปริมาตรอาหารเหลว น้ำมะพร้าว 1 ลิตร ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 เมื่อแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้นในถังหมัก ทรงกระบอกแบบหมุน ความเร็วรอบ 5 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

SOV	df	MS					
		Wet weight	Acidity	Gluconic acid	Sugar utilization	Cellulose production (g/100 g sugar consumption)	Cellulose production (g/100 100 ml media)
Treatment	2	4755.01*	0.13*	0.041*	202.50*	28.05*	11.75*
Error	6	584.107	6.00E ⁻⁰⁴	7.13E ⁻⁰⁴	7.09	1.59	6.32E ⁻⁰²

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ค.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าน้ำหนักเปียก ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณการใช้ไนโตรเจน ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ผลผลิตเซลลูโลสต่อ 100 กรัม น้ำตาลที่ใช้ และผลผลิตเซลลูโลสต่อปริมาตรอาหารเหลว น้ำมะพร้าว 1 ลิตร ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 เมื่อแปรอัตราส่วน C:N ในถังหมัก ทรงกระบอกแบบหมุน ความเร็วรอบ 5 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

SOV	df	MS					
		Wet weight	Acidity	Nitrogen utilization	Sugar utilization	Cellulose production (g/100 g sugar consumption)	Cellulose production (g/100 100 ml media)
Treatment	2	6529.00*	0.17*	38.62*	93.39*	0.15	3.15
Error	6	85.08	1.13E ⁻⁰³	1.79	44.14	1.98	1.21

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ค.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าน้ำหนักเปียก ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ผลผลิตเซลลูโลสต่อ 100 กรัม น้ำตาลที่ใช้ และผลผลิตเซลลูโลสต่อปริมาตรอาหารเหลว น้ำมะพร้าว 1 ลิตร ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 เมื่อแปรปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน ความเร็ว 5 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

SOV	df	MS				
		Wet weight	Acidity	Sugar utilization	Cellulose production (g/100 g sugar consumption)	Cellulose production (g/100 100 ml media)
Treatment	2	19727.33*	0.25*	17.88*	72.57*	4.87*
Error	6	730.94	3.00E ⁻⁰⁴	4.92	4.74	1.44

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ค.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าน้ำหนักเปียก ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณกรดกลูโคนิก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ผลผลิตเซลลูโลสต่อ 100 กรัม น้ำตาลที่ใช้ และผลผลิตเซลลูโลสต่อปริมาณอาหารเหลว น้ำมะพร้าว 1 ลิตร ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในสภาวะถังหมักทรงกระบอกแบบหมุน สภาวะนิ่ง และเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

SOV	df	MS					
		Wet weight	Acidity	Gluconic acid	Sugar utilization	Cellulose production (g/100 g sugar consumption)	Cellulose production (g/100 100 ml media)
Treatment	2	19.74*	2.47E ⁻⁰² *	0.101*	24.45	30.83*	7.07*
Error	6	2.77	1.00E ⁻⁰⁴	3.84E ⁻⁰⁴	8.79	1.74	3.91E ⁻⁰²

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

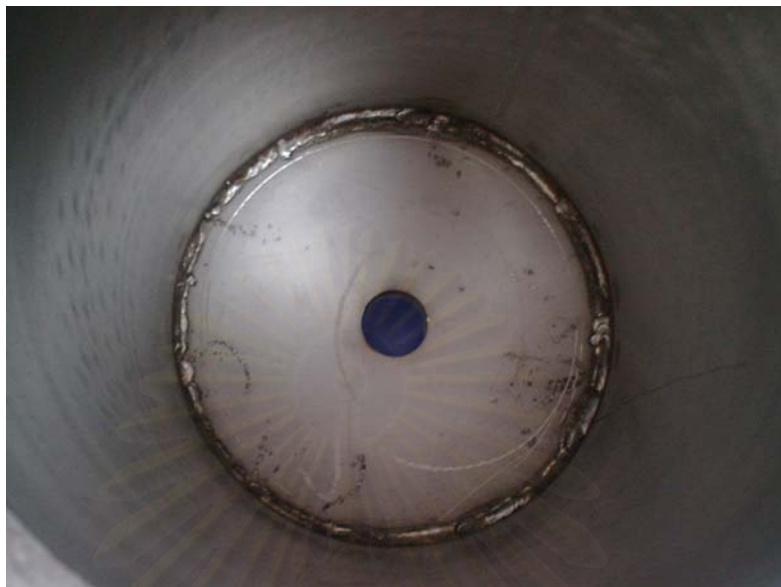
ภาคผนวก ง
รายการรูปประกอบ



รูป ง.1 ถังหมักทรงกระบอกแบบหมุนบนแท่นหมุน



รูป ง.2 ตัวถังหมักทรงกระบอกขนาด 20.8 x 33 เซนติเมตร



รูป ง.3 ภายในถึงหมักทรงกระบอก



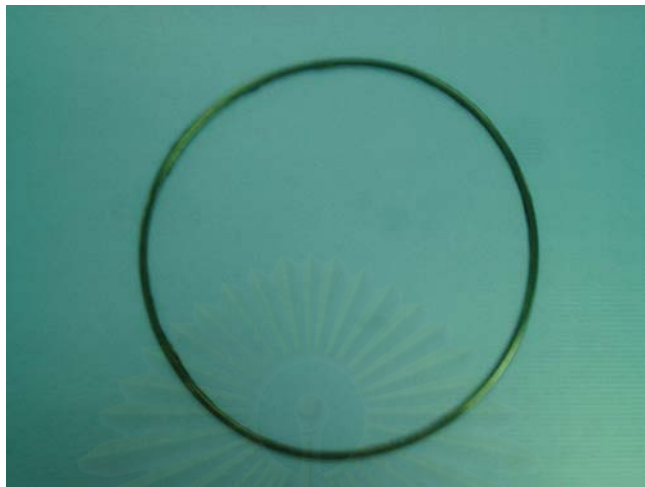
รูป ง.4 ด้านในของฝาถึงหมัก



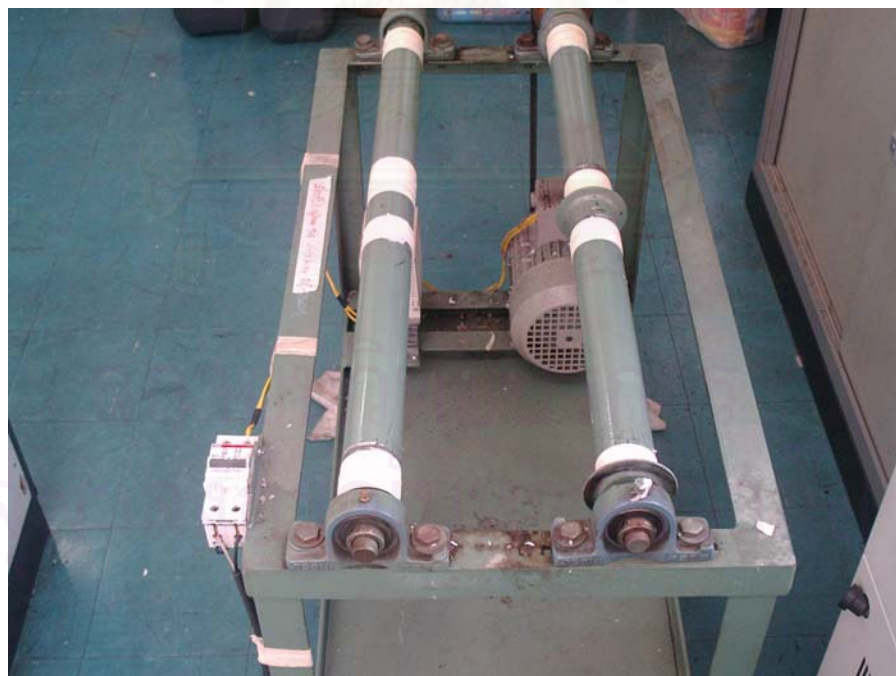
รูป ง.5 ด้านนอกของตัวฝาถังหมัก



รูป ง.6 ฝาปิดเปิดของช่องสำหรับสูมตัวอย่าง



รูปที่ ง.7 ยางโอริงสำหรับปิดฝาให้สนิท



รูปที่ ง.8 แท่นหมุนของถังหมัก ประกอบด้วย มอเตอร์ ท่อสำหรับกึ่งและสวิทช์ เปิด-ปิดเครื่อง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายบุญฤทธิ์ ฤทัยคงถาวร เกิดวันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ. 2519 ที่จังหวัดราชบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏสวนดุสิต กรุงเทพมหานคร ในปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2543

ผลงานทางวิชาการ

- Ruthaikongtaworn, B., Tantratian, S., and Pradistsuwana, C. 2003. Cellulose production by *Acetobacter xylinum* in rotating drum fermenter. Poster presentation. Thaifex and Thaimex 20th : The innovation of health foods. 30-31 May. Samutprakarn : BITEC Bangna, Thailand.

- Ruthaikongtaworn, B., Tantratian, S., and Pradistsuwana, C. 2004. Effect of Oxygen transfer rate on the production of cellulose by *Acetobacter*. Poster presentation. The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB) : Sustainable Development of SMEs Through Biotechnology. 3-6 Feb. Chiang Mai : Pang Suan Kaew Hotel, Thailand.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย