

การคัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์และกระบวนการผลิตเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่ำด้วยจุลินทรีย์โพร  
ไบโอติกโดยใช้น้ำสับปะรด



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAINS ISOLATION AND PRODUCTION OF BACTERIAL CELLULOSE ENRICHED WITH  
PROBIOTIC BY USING PINEAPPLE JUICE



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 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์และกระบวนการผลิต เซลล์ulos จากแบคทีเรียที่อุดมด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติกโดย ใช้น้ำสับปะรด
โดย	น.ส.ชญาภรณ์ ตันติธรรม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ชาลีตา บรมพิชัยชาติกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงษ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิมจงใจรัก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชาลีตา บรมพิชัยชาติกุล)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวิณี ดีแท้)

ชญาภรณ์ ดันติธรรม : การคัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์และกระบวนการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่อุดมด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติกโดยใช้น้ำ  
 สับประรด. ( STRAINS ISOLATION AND PRODUCTION OF BACTERIAL CELLULOSE ENRICHED WITH PROBIOTIC BY USING  
 PINEAPPLE JUICE) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาแนวทางการใช้สับประรดคกเกรดผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่อุดมด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติก เพื่อเป็น  
 เครื่องดื่มฟังก์ชัน งานวิจัยประกอบด้วย (i) ประเมินความเป็นไปได้ในการใช้น้ำสับประรดเต็มส่วน (pH 4.0) เพื่อผลิต Bacterial cellulose (BC) โดยเติมเพียง  
 แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (0.6 % (w/v)) สำหรับชักนำการทำงานของเอนไซม์ cellulose synthase โดยทดลองหมักด้วยแบคทีเรียมาตรฐาน  
 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Gluconacetobacter xylinus* TISTR 1064 (ATCC 23767), *Komagataeibacter xylinus* TISTR 086, *K. xylinus* TISTR 428 และ  
*K. xylinus* TISTR 1061 พบว่า แต่ละสายพันธุ์ผลิต BC ในน้ำสับประรดได้แตกต่างกัน โดย TISTR 428 ผลิต BC ได้มากที่สุด (105.10±0.08 g/L) ( $p < 0.05$ )  
 จึงเลือกมาประเมินสภาวะการหมัก โดยแปรพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศ และปริมาณของน้ำสับประรด พบว่า ค่า BC yield (y) มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับ  
 อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศต่อปริมาตรน้ำหมัก (x) ดังสมการ  $y = 19.422x + 25.936$  ( $R^2 = 0.9346$ ) และพบว่า เมื่ออัตราส่วนระหว่างพื้นที่  
 ผิวสัมผัสอากาศต่อปริมาตรของน้ำหมักเพิ่มขึ้น Hardness และ Cohesiveness มีค่าลดลง ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่ Springiness, Gumminess และ  
 Chewiness มีค่าเพิ่มขึ้น ( $p < 0.05$ ) (ii) คัดแยกแบคทีเรียผลิต BC เพื่อพัฒนาเป็นสายพันธุ์จำเพาะในการหมักน้ำสับประรด โดยคัดแยกจากน้ำหมักสมุนไพรที่มี  
 ส่วนผสมของน้ำและ/หรือน้ำสับประรดที่มีอายุการหมัก 8 ปี 5 ปี และ 10 เดือน พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีสมบัติสร้างสารคล้าย BC ในน้ำสับประรด  
 ทั้งหมด 4 ไอโซเลท จากน้ำหมักอายุ 10 เดือน เมื่อระบุชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 16s rDNA/RNA พบว่า ไอโซเลท K1, K4, K8 และ  
 K3 ที่สร้างสารคล้าย BC คือ *Kodamaea ohmeri* (98.33%) *Acinetobacter* sp. (73.97%) *Enterobacter cloacae* (82.31%) และ *G. xylinus*  
 (80.16%) ตามลำดับ เลือก K3 ที่มีสมบัติทางจลโนไหวที่ตรงกับสายพันธุ์ทางการค้า และเมื่อนำมาศึกษาสมบัติการสร้าง BC ในน้ำสับประรด พบว่า สามารถ  
 สร้าง BC ได้มากกว่าและเร็วกว่าสายพันธุ์ TISTR ถึง 2 เท่า จึงนำไอโซเลท K3 มาพัฒนาเป็นสายพันธุ์จำเพาะในการผลิต BC ในน้ำสับประรด โดยเฉพาะเลี้ยง  
 ภายใต้สภาวะที่ประเมินได้จาก (i) และแปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) ปริมาณแหล่งไนโตรเจน (เพปโทน) และปริมาณสารชักนำ (ไซโตเดียมไดไฮโดรเจน  
 ฟอสเฟต) โดยใช้แผนการทดลองแบบ 3x2x2 แฟคทอเรียล พบว่า สภาวะที่มีปริมาณซูโครส เพปโทน และไซโตเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 5, 0.5  
 และ 0 % (w/v) ตามลำดับ มีปริมาณ BC ภายหลังการหมักสูงสุด (188.27±0.50 g/L) BC ที่ได้มีปริมาณความชื้นและค่า Aw สูงกว่าสภาวะอื่น ( $p < 0.05$ )  
 และเมื่อวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (Texture profile analysis) พบว่า มีค่า Hardness ต่ำที่สุด และค่า Springiness สูงที่สุด น้ำสับประรดหลังหมักประกอบด้วย  
 กรดอินทรีย์หลักมากที่สุด คือ กรดซิตริก กรดมาลิก และกรดแอสซิดิก ตามลำดับ น้ำตาลประกอบด้วยฟรุกโทสมากที่สุด รองลงมา คือ กลูโคส และซูโครส  
 ตามลำดับ อีกทั้งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด ( $p < 0.05$ ) และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด ( $p < 0.05$ ) (iii) นำสภาวะที่ประเมินได้จาก (ii) มาใช้ในการ  
 ผลิต BC ที่อุดมด้วยโพรไบโอติก โดยการเพาะเลี้ยง K3 ร่วมกับจุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* FTCU10621 พบว่า BC ที่ได้มีปริมาณน้อยลง  
 (26.40±0.80 g/L) และเป็น young BC และตรวจวัด *L. plantarum* FTCU10621 ในส่วน BC พบจำนวน 8.42±0.52 log CFU/g BC และในน้ำสับประรด  
 จำนวน 8.33±0.03 log CFU/ml ภาพถ่ายทางสัณฐานวิทยาของผิวหน้า BC พบเซลล์โพรไบโอติกถูกตรึงอยู่ใน BC คิดเป็น 7.08 log cell/g BC เมื่อวิเคราะห์  
 โครงสร้างทางเคมีของ BC ด้วยเทคนิค FTIR พบว่า สเปกตรัม IR ของหมู่ไฮดรอกซิลมี % transmittance ต่ำ ส่งผลให้ BC มีลักษณะอ่อนนุ่ม และน้ำสับประรด  
 หลังหมักประกอบด้วยกรดอินทรีย์หลักมากที่สุด คือ กรดแลคติก กรดซิตริก กรดซัคซินิก และกรดมาลิก ตามลำดับ น้ำตาลประกอบด้วยฟรุกโทสมากที่สุด  
 รองลงมา คือ กลูโคส และซูโครส ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร  
 ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนิสิต .....  
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....  
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 6370113823 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD: Bacterial cellulose, Komagataeibacter xylinus, pineapple juice, probiotic

Chayaporn Thanthithum : STRAINS ISOLATION AND PRODUCTION OF BACTERIAL CELLULOSE ENRICHED WITH PROBIOTIC BY USING PINEAPPLE JUICE. Advisor: Assoc. Prof. Dr. CHEUNJIT PRAKITCHIWATTANA Co-advisor: Assoc. Prof. Dr. CHALEEDA BOROMPICHAICHARTKUL

This study aimed to develop functional drinks from unqualified pineapple juice containing BC enriched with probiotic. The study was divided into 3 parts. (i) Evaluation of BC production from 100% pineapple juice (pH 4.0) by adding only ammonium dihydrogen phosphate (0.6% (w/v)) for inducing cellulose synthase activity. The medium was fermented with 4 standard strains including *Gluconacetobacter xylinus* TISTR 1064 (ATCC 23767), *Komagataeibacter xylinus* TISTR 086, *K. xylinus* TISTR 428, and *K. xylinus* TISTR 1061. Each strain displayed different properties in BC production under pineapple condition. Results demonstrated that TISTR 428 yielded the highest BC production (105.10±0.08 g/L) ( $p < 0.05$ ) and therefore was selected to assess the fermentation conditions by varying the surface areas. The results indicated that BC yield (y) was linearly related to the surface area to volume ratio (x);  $y = 19.422x + 25.936$  ( $R^2 = 0.9346$ ). With the increase in surface area to volume ratio, hardness and cohesiveness were decreased while springiness, gumminess, and chewiness were increased ( $p < 0.05$ ). (ii) BC-producing strains from fermented herbal juice containing pineapple which aged 8 years, 5 years, and 10 months were isolated. Four isolates producing BC-like substance in pineapple juice were obtained from 10<sup>th</sup> months fermented herbal juice. Through 16s rDNA/RNA gene sequence analysis, K1, K4, K8, and K3 were *Kodamaea ohmeri* (98.33%), *Acinetobacter* sp. (73.97%), *Enterobacter cloacae* (82.31%), and *G. xylinus* (80.16%), respectively. K3 that genotypic properties matched commercial strain and generated BC twice time faster than TISTR strain was selected and developed as a BC-producing specific strain for pineapple juice fermentation. Culture conditions were assessed under various carbon sources (sucrose), nitrogen source (peptone) and inducer (sodium dihydrogen phosphate) using 3x2x2 factorial experimental design. It was found that condition with sucrose, peptone, and sodium dihydrogen phosphate at concentrations of 5, 0.5 and 0 % (w/v), respectively, yielded the highest BC production (188.27±0.50 g/L). Moisture content and Aw of this BC were higher than in other conditions ( $p < 0.05$ ). BC also had the lowest hardness and highest springiness. After fermentation, pineapple juice contained main organic acids including citric, malic, and acetic acids, respectively. Main sugars included fructose, glucose, and sucrose, respectively. The fermented juice had the highest phenolic compound and the highest antioxidant activity ( $p < 0.05$ ). (iii) Co-culture fermentation of K3 and *Lactobacillus plantarum* FTCU10621 with condition from ii were investigated. It was found that BC yield was lower (26.40±0.80 g/L) with young texture. BC contained *L. plantarum* FTCU10621 with 8.42±0.52 log CFU/g BC. *L. plantarum* FTCU10621 was observed in pineapple juice at 8.33±0.03 log CFU/ml. SEM showed probiotic cells embedded in the BC counted as 7.08 log cell/g BC. The chemical structure of the BC by FTIR provided that IR spectra of the hydroxyl groups had low % transmittance, hence BC allowing to be soft. After fermentation, pineapple juice contained main organic acids including lactic, citric, succinic, and malic acids, respectively. Also contained sugars including fructose, glucose, and sucrose, respectively.

Field of Study: Food Technology

Academic Year: 2021

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ซาลีดา บรมพิชัยชาติกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความรู้ แนวคิด และคำแนะนำในการทำวิจัยด้วยความเอาใจใส่ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในงานวิจัยฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานต์ เศรษฐชัยมงคล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐธิดา โชติช่วง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวินี ดีแท้ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้อง สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือด้านต่างๆ รวมถึงอำนวยความสะดวกตลอดการทำงานวิจัย ขอขอบคุณเพื่อนร่วมรุ่น และรุ่นพี่ที่คอยช่วยเหลือสนับสนุนเสมอมา สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่คอยให้กำลังใจ และส่งเสริมเสมอมา

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงด้วยการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ และทุนอุดหนุนการวิจัยจากกลุ่มวิจัย (STAR) “การพัฒนาอาหารและวัตถุดิบอาหารจากนวัตกรรมกรรมหมักด้วยจุลินทรีย์” และทุนอุดหนุนการศึกษาจากทุนวิทยบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ชญาภรณ์ ตันติธรรม

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ง
กิตติกรรมประกาศ .....	จ
สารบัญ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ .....	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 Bacterial cellulose (BC).....	3
2.2 สับปะรด .....	13
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	15
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย .....	18
3.1 วัตถุประสงค์ อุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	18
3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย .....	21
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	27
4.1 ประเมินการผลิต BC ในน้ำสับปะรดด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน .....	27
4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Bacterial Cellulose (BC) ในน้ำสับปะรด .....	34
4.3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติก ร่วมกับการสร้าง BC ด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์ออโตคอสในน้ำ สับปะรดตกเกรด .....	50
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	56
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	56

5.2 ข้อเสนอแนะ .....	58
บรรณานุกรม.....	59
ภาคผนวก.....	70
ภาคผนวก ก การระบุสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลทด้วยวิธีอณูจุลชีววิทยา.....	71
ภาคผนวก ข การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	72
ภาคผนวก ค โครมาโทแกรมการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำหมักด้วยวิธี HPLC .....	74
ภาคผนวก ง สเปกตรัม IR ของ BC .....	91
ประวัติผู้เขียน.....	92





## สารบัญภาพ

### หน้า

ภาพที่ 2.1 Bacterial cellulose (a) โครงสร้างทางเคมีของ BC และ (b) ลักษณะของเส้นใย BC.....	3
ภาพที่ 2.2 Komagataeibacter spp. (a) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ (b) ลักษณะของเซลล์.....	4
ภาพที่ 2.3 Cellulose synthase operon ประกอบด้วย bcsA, bcsB, bcsC และ bcsD โดย BC จะถูกปลดปล่อยออกสู่นอกเซลล์ในลักษณะของ Sub-elementary fibrils (SEFs) ก่อนจะรวมตัวเป็น Microfibrils (MFs).....	5
ภาพที่ 2.4 กระบวนการผลิต BC.....	7
ภาพที่ 2.5 การประยุกต์ใช้เซลลูโลสจากจุลินทรีย์ (a) แอโรเจล (b) ผ้าพันแผล (c) กระดาษแม่เหล็ก (d) ไบโอบีโอสเซนเซอร์ (e) เยื่อปูในเครื่องเสียง (f) วัสดุบรรจุภัณฑ์ (ข้าว) คอมบูชา (ชา).....	8
ภาพที่ 2.6 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของสายพันธุ์ C18 .....	15
ภาพที่ 2.7 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของสายพันธุ์ ZHCJ618 .....	16
ภาพที่ 4.1 สมบัติของน้ำหมักในการผลิต BC ของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ (A) <i>G. xylinus</i> TISTR 1064, (B) <i>K. xylinus</i> TISTR 086, (C) <i>K. xylinus</i> TISTR 428 และ (D) <i>K. xylinus</i> TISTR 106129	
ภาพที่ 4.2 ผลของพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศและปริมาตรของน้ำหมักสับปะรดต่อการผลิต BC ด้วย <i>K. xylinus</i> TISTR 428 .....	32
ภาพที่ 4.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพร (8 ปี, 5 ปี และ 10 เดือน) โดยตรง และ pre-enrichment 4 ชนิด ได้แก่ น้ำสับปะรดคั้นสด (FP); น้ำสับปะรดคั้นสดเติมแอลกอฮอล์ 2 % (v/v) (FP+2% eth); น้ำสับปะรดพาสเจอร์ไรส์เต็มส่วน (PP); และน้ำสับปะรดพาสเจอร์ไรส์เติมแอลกอฮอล์ 2 % (v/v) (PP+2% eth).....	37
ภาพที่ 4.4 การผลิต BC ในน้ำสับปะรดด้วยไอโซเลท K3 และแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน <i>K. xylinus</i> TISTR 428 วันที่ 4 ของการหมักที่อุณหภูมิห้อง.....	39
ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงความหนาของ BC (mm) ที่ผลิตด้วยไอโซเลท K3 ในน้ำสับปะรดแปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 % (w/v) แหล่งไนโตรเจน (เพปโทน) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.5 % (w/v) และแปรปริมาณสารชักนำ (โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.4 % (w/v) ทั้งหมด 12 สภาวะ หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน.....	43

ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงของน้ำส้มประด แปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 % (w/v) แหล่งไนโตรเจน (เพพโทน) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.5 % (w/v) และแปรปริมาณสารชักนำ (โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.4 % (w/v) ทั้งหมด 12 สภาวะ ภายหลังจากหมักด้วยไอโซเลท K3 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน โดยที่ <sup>a-h</sup>เปรียบเทียบร้อยละของ TA ที่เพิ่มขึ้น (TA promotion, %) <sup>a-c</sup>เปรียบเทียบร้อยละของ pH ที่ลดลง (pH reduction, %) และ <sup>A-H</sup>เปรียบเทียบร้อยละของ TSS ที่ลดลง (TSS reduction, %) ของน้ำส้มประด ภายหลังจากหมัก (p<0.05)..... 44

ภาพที่ 4.7 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (Total phenolic compound, TPC) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (DPPH radical scavenging activity) ของน้ำส้มประดก่อนหมัก (C) และน้ำส้มประดภายหลังจากหมักด้วยไอโซเลท K3 แปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 % (w/v) แหล่งไนโตรเจน (เพพโทน) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.5 % (w/v) และแปรปริมาณสารชักนำ (โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.4 % (w/v) ทั้งหมด 12 สภาวะ หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน โดยที่ <sup>a-h</sup>เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (Total phenolic compound, TPC) <sup>a-h</sup>เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (DPPH radical scavenging activity) (p<0.05)..... 45

ภาพที่ 4.8 สีของ BC ภายหลังจากหมักด้วยไอโซเลท K3 แปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 % (w/v) แหล่งไนโตรเจน (เพพโทน) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.5 % (w/v) และแปรปริมาณสารชักนำ (โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.4 % (w/v) ทั้งหมด 12 สภาวะ หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน..... 46

ภาพที่ 4.9 ภาพถ่ายทางสัณฐานวิทยาของ BC (a) ไอโซเลท K3 ในน้ำส้มประดภายใต้สภาวะ 121 และ (b) โพรไบโอติกร่วมกับไอโซเลท K3 ในน้ำส้มประดภายใต้สภาวะ 121 ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า..... 55

ภาพที่ 4.10 IR สเปกตรัมของ BC ผลิตจากไอโซเลท K3 ในน้ำส้มประดภายใต้สภาวะ 121 (BC) และโพรไบโอติกร่วมกับไอโซเลท K3 ในน้ำส้มประดภายใต้สภาวะ 121 (BC probiotic) ..... 55

## สารบัญตาราง

## หน้า

ตารางที่ 2.1 ความหลากหลายของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต BC ข้อมูลจาก Shah et al. (2013)	11
ตารางที่ 2.2 บทบาทของสารชักนำในกระบวนการผลิต BC ข้อมูลจาก Andriani et al. (2020)....	12
ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศและปริมาตรน้ำหมัก.....	22
ตารางที่ 3.2 การแปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (A) คือ ซูโครส (3 ระดับ) ปริมาณแหล่งไนโตรเจน (B) คือ เพพโทน (2 ระดับ) และปริมาณสารชักนำ (C) คือ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต หรือ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (2 ระดับ) ในน้ำสับประรด โดยออกแบบแผนการทดลองแบบ 3x2x2 แฟคทอเรียล .....	24
ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเปียกของ BC (g/L) ภายหลังจากหมัก.....	29
ตารางที่ 4.2 ผลของพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศและปริมาตรของน้ำหมักสับประรดต่อ BC yield (%) และ Texture profile ของ BC ที่ผลิตด้วย <i>K. xylinus</i> TISTR 428 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ .....	33
ตารางที่ 4.3 แสดงสมบัติการสร้าง BC ในน้ำสับประรดด้วยไอโซเลท ภายหลังจากหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน .....	38
ตารางที่ 4.4 ระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 16s rDNA/RNA .....	39
ตารางที่ 4.5 เนื้อสัมผัสของ BC ภายหลังจากหมักด้วยไอโซเลท K3 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน .....	47
ตารางที่ 4.6 น้ำหนักเปียก (g/L) water activity ( $A_w$ ) และความชื้น (%) ของ BC ภายหลังจากหมักด้วยไอโซเลท K3 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน .....	48
ตารางที่ 4.7 ค่าสีของ BC ภายหลังจากหมักด้วยไอโซเลท K3 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน .....	49
ตารางที่ 4.8 จำนวนประชากรจุลินทรีย์ใน BC และน้ำหมักสับประรดภายหลังจากหมักไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดี่ยว และการหมักไอโซเลท K3 ร่วมกับ <i>L. plantarum</i> FTCU10621 ภายใต้อุณหภูมิห้อง .....	53

ตารางที่ 4.9 สมบัติทางกายภาพของ BC ภายหลังจากหมักไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดียว (121) และ  
 การหมักไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 (121+probiotic) ภายใต้อุณหภูมิ 121  
 ..... 54

ตารางที่ 4.10 สมบัติทางกายภาพของน้ำสับปะรดก่อนการหมัก น้ำสับปะรดภายหลังจากหมักด้วย  
 ไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดียว (121) และน้ำสับปะรดภายหลังจากหมักด้วยไอโซเลท K3 ร่วมกับ  
*L. plantarum* FTCU10621 (121+probiotic) ภายใต้อุณหภูมิ 121..... 54



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

สับปะรดจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร (2563) รายงานว่า ผลิตภัณฑ์สับปะรดมีมูลค่าส่งออกสูงถึง 14,825 ล้านบาท ในปี 2563 โดยผลผลิตสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียร้อยละ 80 ถูกส่งเข้าสู่โรงงาน เนื่องด้วยลักษณะทางกายภาพทนต่อกระบวนการผลิตแปรรูป ทั้งนี้อุตสาหกรรมมีการกำหนดคุณภาพมาตรฐานในการรับซื้อผลสับปะรดเพื่อมาเป็นวัตถุดิบในการแปรรูป ในปี 2563 สภาพอากาศแล้ง ส่งผลให้ผลผลิตลดลง ผลสับปะรดตกเกรดแคะแกระไม่มีน้ำหนัก ขายไม่ได้ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่สับปะรดตกเกรดเหล่านี้ จึงสนใจที่จะนำมาพัฒนาเป็นน้ำหมักจุลินทรีย์เพื่อสร้างเซลลูโลส เรียกว่า Bacterial cellulose (BC) ในอุตสาหกรรมอาหารเป็นที่รู้จักในรูปแบบ菌絲膜ผลิตโดยใช้แบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* (หรือเรียกว่า *Komagataeibacter xylinus*) หมักน้ำมะพร้าว (Liu, Liu, et al., 2018) 菌絲膜ได้รับความนิยมนอกจากมี รสสัมผัสดี โยอาหารสูง ไขมันและพลังงานต่ำ และมีรายงานถึงสมบัติในการช่วยป้องกันโรคถุงผนังลำไส้อักเสบ และป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Mesomya et al., 2008) นอกจากนี้ BC เป็นเส้นใยอาหาร จัดอยู่ในกลุ่ม Generally recognized as safe (GRAS) อีกด้วย (Azeredo et al., 2019) การผลิต BC ด้วยแบคทีเรียสามารถผลิตได้โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสสูง น้ำผลไม้อื่นๆ นอกเหนือจากน้ำมะพร้าวจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ จึงมีความเป็นไปได้ที่การเพาะเลี้ยงในอาหารทางเลือกอย่างเช่น น้ำสับปะรด อย่างไรก็ตามน้ำผลไม้ชนิดที่มีความเป็นกรดสูงอาจส่งผลให้มีผลผลิต BC ต่ำลง ดังนั้นการคัดแยกสายพันธุ์จากแหล่งธรรมชาติที่มีส่วนประกอบของสับปะรดให้เป็นสายพันธุ์จำเพาะกับการหมัก BC จากน้ำสับปะรด (Autochthonous) จึงเป็นแนวทางในการได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิต BC ในน้ำสับปะรด นอกจากนี้การศึกษานี้ยังมีแนวคิดในการเพิ่มคุณค่าด้านการส่งเสริมสุขภาพของ BC จาก น้ำสับปะรดโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์โพรไบโอติก ซึ่งมีรายงานว่า การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ร่วมกัน (Co-culture) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมการสร้างสารเมแทบอไลต์ (Prabhu et al., 2022) จุลินทรีย์โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ในอาหารหมัก เช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว มีคุณสมบัติเป็นประโยชน์ต่อระบบขับถ่าย (Shi et al., 2016) ดังนั้นหากสามารถผลิต BC ที่อุดมด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากน้ำสับปะรดได้ จะเป็นแนวทางสำคัญในการเพิ่มมูลค่าให้กับสับปะรดตกเกรด

## 1.2 วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแนวทางการใช้สับปะรดตกเกรดผลิตเซลล์ULO จากแบบที่เรียที่อุดมด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติก เพื่อเป็นเครื่องดื่มฟังก์ชัน โดยการหมักน้ำสับปะรดด้วย จุลินทรีย์ Autochthonous strains ที่คัดแยกจากน้ำหมักสมุนไพรที่มีส่วนประกอบของสับปะรด ขั้นตอนงานวิจัยประกอบด้วย การประเมินการใช้น้ำสับปะรดผลิต BC การคัดแยกและคัดเลือก สายพันธุ์ของจุลินทรีย์เพื่อเป็น Autochthonous strains การศึกษาสมบัติการหมักและพัฒนา กระบวนการหมักสำหรับผลิต BC และการเจริญร่วมกับจุลินทรีย์โพรไบโอติก

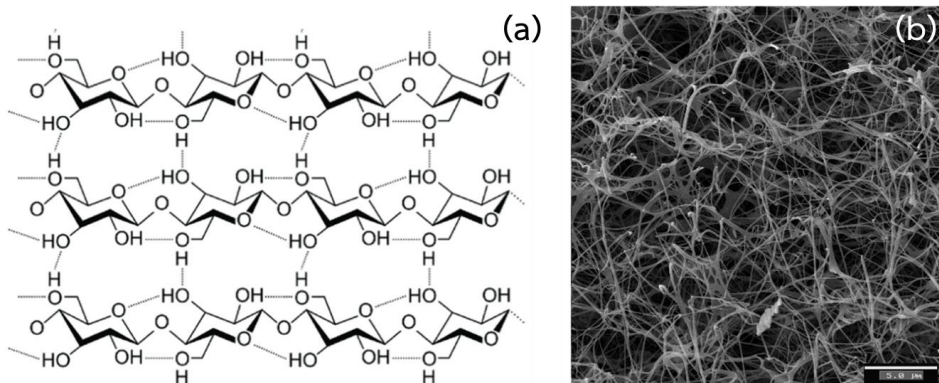


## บทที่ 2

### วารสารปริทัศน์

#### 2.1 Bacterial cellulose (BC)

ในปี 1886 นักวิจัยค้นพบว่า ชีวนุ่นที่ลอยตัวอยู่บนผิวน้ำหมักในระหว่างกระบวนการหมักน้ำส้มสายชู คือ เซลลูโลสที่แบคทีเรียกรดแอสिटิก (สกุล *Acetobacter*) ผลิตขึ้นมาปกป้องเซลล์จากรังสียูวี และป้องกันเซลล์จากการขาดน้ำ (Brown, 1886) ต่อมาค้นพบว่า นอกจากแบคทีเรียกรดแอสिटิกแล้ว จุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ สามารถผลิตเซลลูโลสได้เช่นเดียวกัน ได้แก่ *Gluconacetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* และ *Sarcina* เป็นต้น ภายหลังจากเรียกเซลลูโลสที่ผลิตด้วยจุลินทรีย์นี้ว่า “Bacterial cellulose (BC)” (Azeredo et al., 2019) BC มีโครงสร้างทางเคมีเช่นเดียวกับเซลลูโลสจากพืช ประกอบด้วยพอลิเมอร์สายตรงของโมเลกุลกลูโคสที่เชื่อมกันต่อด้วยพันธะ 1,4 glycosidic พอลิเมอร์แต่ละสายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ดังภาพที่ 2.1 อย่างไรก็ตาม BC มีความบริสุทธิ์สูงกว่าเซลลูโลสจากพืช เนื่องจากไม่มีเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเจือปน อีกทั้งความแตกต่างของโครงสร้างเส้นใยนาโน ทำให้ BC มีสมบัติทางเคมีกายภาพที่จำเพาะ เช่น มีค่ามอดุลัสของยัง (Young's modulus) สูง มีความสามารถในการจับน้ำ (Water holding capacity, WHC) สูง ความเป็นผลึกสูง ความพรุนสูง ความโปร่งใสสูง ความสามารถในการกักเก็บน้ำ (Water retention capacity, WRC) สูง และมีปริมาณการเกิดพอลิเมอร์ (Degree of polymerization) สูง (Chen et al., 2021; Liu et al., 2021; Santos et al., 2015) โดยมีรายงานว่า *Acetobacter xylinum* (หรือเรียกว่า *Gluconacetobacter xylinus* หรือ *Komagataeibacter xylinus*) เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิต BC มากที่สุด (Azeredo et al., 2019)

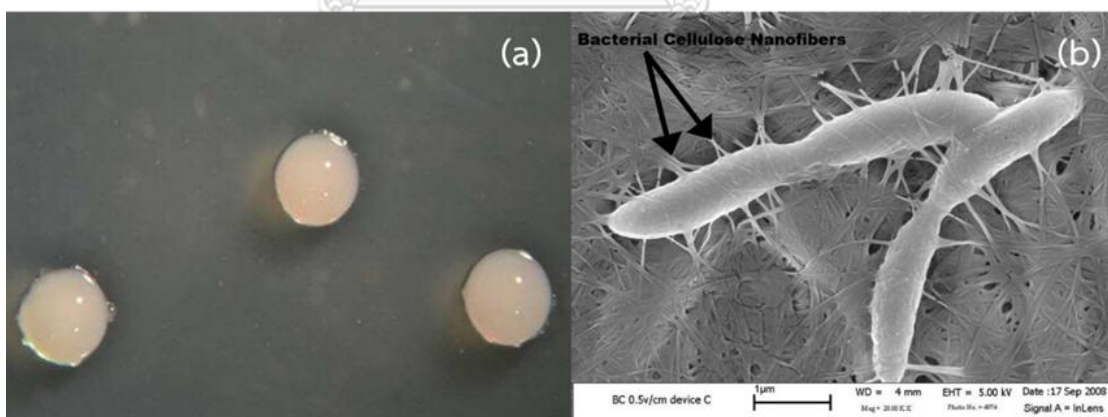


ภาพที่ 2.1 Bacterial cellulose (a) โครงสร้างทางเคมีของ BC และ (b) ลักษณะของเส้นใย BC

(Pogorelova et al., 2020; Torres et al., 2012)

### 2.1.1 *Komagataeibacter xylinus* (Brown 1886) Yamada et al. 2013

*Komagataeibacter xylinus* (Basonym: *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* (Brown, 1886; De Ley & Frateur, 1970)) หรือเรียกว่า *A. xylinus* (Brown, 1886; Yamada & Kondo, 1984) หรือ *G. xylinus* (Brown, 1886; Yamada et al., 2012) หรือ *Bacterium xylinum* (Brown, 1886) จัดอยู่ในสกุล *Acetobacter* เป็นแบคทีเรียกรดแอสिटิก (Acetic acid bacteria) มีความสามารถในการผลิตกรดแอสिटิกจากกลูโคสและ/หรือเอทานอล และมีความสามารถในการออกซิไดซ์กรดแอสिटิกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ อีกทั้งยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อผลิต BC ได้หลากหลาย เช่น กลูโคส กลีเซอรอล และสารอินทรีย์อื่นๆ *K. xylinus* มีลักษณะเซลล์เป็นรูปแท่ง ขนาดยาว 2-10 microns กว้าง 0.5-1 micron ย้อมติดสีแกรมลบ โคโลนีมีลักษณะกลมมน ผิวเรียบหรือขรุขระ สีขาวหรือครีมเบจ ดังภาพที่ 2.2 เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น (Obligate aerobic bacterium) จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียชอบสภาวะกรด (Acidophilic bacterium) สามารถมีชีวิตรอดได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำถึง 3.5 และมีช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญในช่วง 4-5.5 ขึ้นกับสายพันธุ์ (Çoban & Biyik, 2011; Raiszadeh-Jahromi et al., 2020) นอกจากนี้จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic bacterium) โดยมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ที่ 28-31 °C (Mohammad et al., 2014) แต่ไม่สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 °C (Ida, 2017)



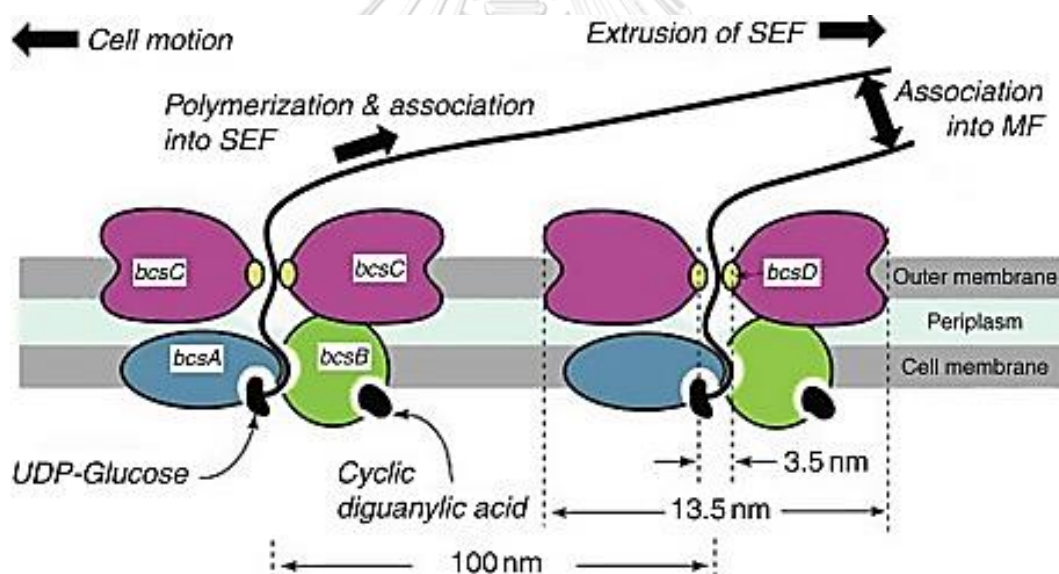
ภาพที่ 2.2 *Komagataeibacter* spp. (a) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ (b) ลักษณะของเซลล์

(Lim et al., 2013; Trulove, 2008)



### 2.1.2 กระบวนการผลิต BC

ในระดับชีวโมเลกุลของกระบวนการผลิต BC ด้วยแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับ Cellulose synthase operons (หรือเรียกว่า bcs operons) operon เหล่านี้ควบคุมการผลิต BC ตั้งแต่ภายในเซลล์ตลอดจนถึงการปลดปล่อย BC สู่นอกเซลล์ จากภาพที่ 2.3 แบคทีเรียแกรมลบ bcs operon ประกอบด้วย 4 subunits transmembrane (TM) complex ได้แก่ (i) bcsA ทำหน้าที่ในการจดจำ Uridine diphosphate glucose (UDP-glucose) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต BC และผลิต BC (ii) bcsB ทำหน้าที่จับกับโคเอนไซม์ Cyclic diguanylate monophosphate (C-di-GMP) (iii) bcsC ทำหน้าที่ในการควบคุมการเกิดผลึกและปลดปล่อย BC ออกสู่นอกเซลล์ ในขณะที่ (iv) bcsD ทำหน้าที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Endo- $\beta$ -1,4-glucanase ที่สามารถย่อยสลายสาย  $\beta$ -1,4-glucan ได้ อย่างไรก็ตามมีเฉพาะ 2 subunits คือ bcsA และ bcsB ที่ทำหน้าที่หลักในการผลิต BC ในขณะที่ subunit อื่นๆ จะแตกต่างกันไปตามแต่ละอนุกรมวิธาน (Taxonomy) (Hashimoto & Koizumi, 2012; Römling & Galperin, 2015)

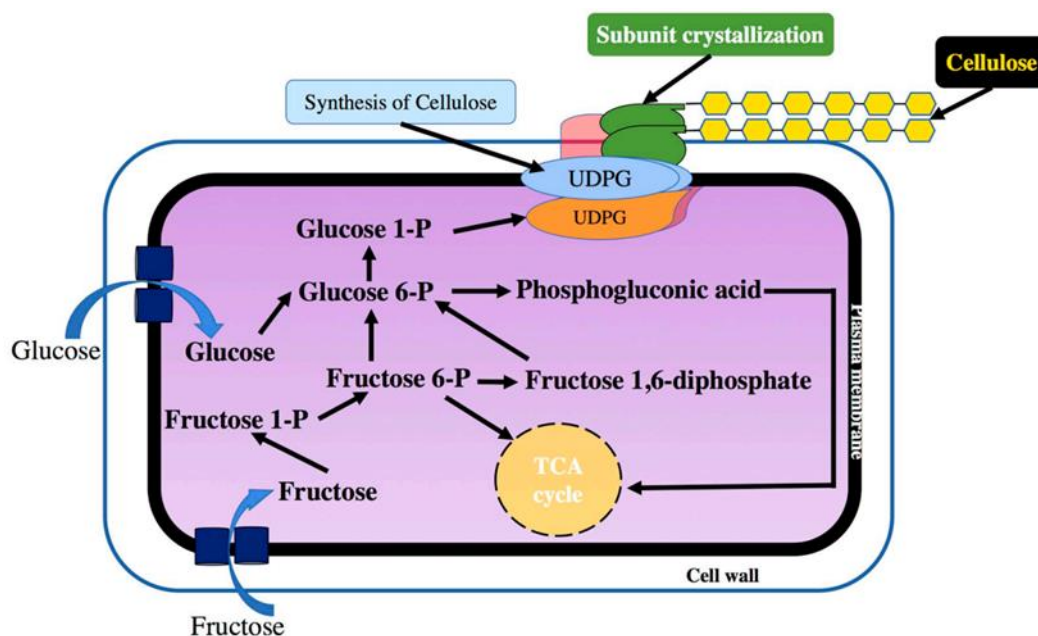


ภาพที่ 2.3 Cellulose synthase operon ประกอบด้วย bcsA, bcsB, bcsC และ bcsD โดย BC จะถูกปลดปล่อยออกสู่นอกเซลล์ในลักษณะของ Sub-elementary fibrils (SEFs) ก่อนจะรวมตัวเป็น Microfibrils (MFs)

ข้อมูลและภาพจาก (Hashimoto & Koizumi, 2012)

กระบวนการผลิต BC อาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ Cellulose synthase (EC 2.4.1.12) ร่วมกับโคเอนไซม์ C-di-GMP ซึ่งทำหน้าที่เป็น Secondary messenger ในการส่งสัญญาณกระตุ้นเอนไซม์ Cellulose synthase ให้เข้าจับกับ UDP-glucose จากนั้นโมเลกุลกลูโคสของ UDP-glucose จะถูกเชื่อมต่อเข้ากับตำแหน่ง 4'hydroxyl group ที่ฝั่ง Non-reducing end ของปลายสายพอลิเมอร์กลูโคส และเกิดผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ คือ Uridine diphosphate (UDP) ต่อมาสายพอลิเมอร์กลูโคสที่ผลิตขึ้นจะถูกเคลื่อนย้ายไปยัง Transmembrane (TM) channel อย่างต่อเนื่อง ทำให้บริเวณ Active site ของเอนไซม์ Cellulose synthase ว่างที่จะจับกับ UDP-glucose โมเลกุลใหม่ ส่งผลให้สามารถสร้างสายพอลิเมอร์กลูโคสให้มีความยาวเพิ่มขึ้นต่อเนื่อง (Morgan et al., 2014) อย่างไรก็ตาม นอกจากเอนไซม์ Cellulose synthase แล้ว แบคทีเรียผลิต BC ในกระบวนการผลิต BC จากกลูโคส (ภาพที่ 2.4) อาศัยเอนไซม์อื่นๆ อีกรวม 4 ชนิด ดังนี้

- (1) กระบวนการเกิด Phosphorylation ดัดหมู่ฟอสเฟตเข้ากับโมเลกุลของกลูโคสได้ผลิตภัณฑ์เป็น Glucose-6-phosphate (G6P) อาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glucokinase (EC 2.7.1.2)
- (2) กระบวนการเกิด Isomerization เปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลจาก G6P เป็น Glucose-1-phosphate (G1P) อาศัยการทำงานของเอนไซม์ Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.5)
- (3) กระบวนการเกิด Conversion ของ G1P เป็น Uridine 5'-diphosphoglucose (UDPG) อาศัยการทำงานของเอนไซม์ UDPG pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9)
- (4) กระบวนการเกิด Polymerization เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุล UDPG ด้วยพันธะ 1,4-glycosidic อาศัยการทำงานของเอนไซม์ Cellulose synthase (EC 2.4.1.12) บน Plasma membrane



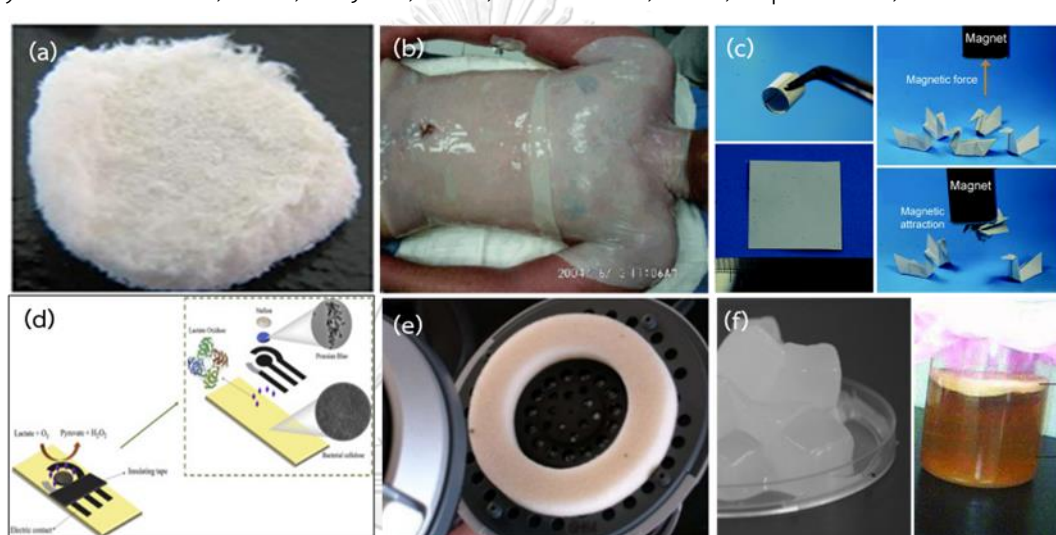
ภาพที่ 2.4 กระบวนการผลิต BC

(Moniri et al., 2017)

BC ถูกผลิตภายในเซลล์ และขับออกที่บริเวณช่องเปิดของผนังเซลล์ BC ที่ผลิตขึ้นเริ่มแรกมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กเพียง 1.5 nm เรียกว่า Sub-elementary fibrils (SEFs) ก่อนที่จะเรียงตัวกันในลักษณะเป็นเกลียว (ribbon) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.5-4 nm เรียกว่า Microfibrils (MFs) จากนั้น MFs จะรวมตัวในลักษณะเป็นเกลียว (ribbon) จนกระทั่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40-60 nm เรียกว่า Nanofiber กระบวนการรวมตัวกันของ SEFs จนกระทั่งเป็น Nanofiber นี้ เรียกว่า Self-assembly process เกิดเป็นแผ่นวุ้นลอยตัวอยู่บนผิวหน้าของอาหารเพาะเลี้ยง (Moniri et al., 2017; Ullah et al., 2019)

### 2.1.3 การประยุกต์ใช้ BC

BC ที่ผลิตขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้หลากหลาย เช่น นำไปผลิตแอโรเจล ใช้ในการกรอง นำไปผลิตผ้าพันแผลและผิวหนังเทียมในทางการแพทย์ ใช้ผสมกับแม่เหล็กผลิตกระดาษแม่เหล็ก นำไปผลิตไบโอเซนเซอร์นำไปใช้เป็นเยื่อในเครื่องเสียง และผลิตเป็นอาหาร เช่น วุ้นสวรรค์ (Nata de coco) โดยผลิตจากการหมักน้ำมะพร้าวด้วย *A. xylinum* อีกทั้งยังเป็นกล้าเชื้อของคอมบูชา (Kombucha) ที่ผลิตจากการหมักชาดำผสมน้ำตาลด้วย Symbiosis culture of bacteria and yeast (SCOBY) ประกอบด้วยแบคทีเรีย คือ *A. xylinum* และยีสต์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* ดัง ภาพ ที่ 2.5 (Halib et al., 2012; Lustrì et al., 2015; Niyazbekova et al., 2018; Quijano, 2017; Revin et al., 2020; Sriplai et al., 2018)



ภาพที่ 2.5 การประยุกต์ใช้เซลลูโลสจากจุลินทรีย์ (a) แอโรเจล (b) ผ้าพันแผล (c) กระดาษแม่เหล็ก (d) ไบโอเซนเซอร์ (e) เยื่อในเครื่องเสียง (f) วุ้นสวรรค์ (ซ้าย) คอมบูชา (ขวา) (Halib et al., 2012; Lustrì et al., 2015; Niyazbekova et al., 2018; Quijano, 2017; Revin et al., 2020; Sriplai et al., 2018)

#### 2.1.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต BC

ในท้องตลาดอุตสาหกรรมอาหารการผลิต BC มีมูลค่าสูงถึง 207.36 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ในปี 2559 และคาดว่าจะมีมูลค่าสูงถึง 700 ล้านดอลลาร์สหรัฐในปี 2565 วุ้นสวรรค์ (หรือเรียกว่า Nata de coco) เป็นผลิตภัณฑ์หลักของ BC ผลิตโดยการหมักน้ำมะพร้าวด้วย *A. xylinum* มีต้นกำเนิดมาจากประเทศฟิลิปปินส์ หันเป็นขึ้นบริโภคนิยมในลักษณะเช่นเดียวกับวุ้นแช่ในน้ำเชื่อม อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยเชิงเทคโนโลยี-เศรษฐกิจรองรับว่า การผลิต BC ในระดับอุตสาหกรรมได้รับผลกระทบจากต้นทุนการผลิตที่สูง (Dourado et al., 2016) เนื่องจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์มีราคาแพง และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีข้อจำกัดมากมาย เช่น อัตราการเจริญเติบโต ความจำเพาะต่อสภาวะการเพาะเลี้ยง และเกิดการกลายพันธุ์ไม่ผลิต BC เป็นต้น นักวิจัยทั่วโลกจึงสนใจที่จะพัฒนาการผลิต BC โดยคัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิต BC สูง การศึกษาพัฒนาถึงภูมิคุ้มกันให้มีความเหมาะสม และการใช้อาหารเพาะเลี้ยงทางเลือกเพื่อลดต้นทุน (Zhong, 2020) จะเห็นได้ว่าการผลิต BC เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณนั้นจำเป็นต้องพิจารณาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต BC ดังนี้

##### (1) สายพันธุ์ของแบคทีเรียผลิต BC

สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในที่นี่ หมายถึง เป็นสายพันธุ์ที่สามารถให้ผลผลิต BC ปริมาณมากในเวลาอันสั้น โดยปกติแล้ว *A. xylinum* ใช้เวลาในการหมักน้ำมะพร้าวเพื่อผลิต BC ราว 10-14 วัน (Santosa et al., 2020) ปัจจุบันมีรายงานว่า การคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติที่มีส่วนประกอบเดียวกับสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเพื่อผลิตนั้น สายพันธุ์ที่ได้จากการคัดแยกดังกล่าว เรียกว่า Autochthonous strains จะมีประสิทธิภาพในการเจริญและผลิตสารเมตาบอไลต์สูงกว่า สายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกมาจากคนละแหล่งกับสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เรียกว่า Allochthonous strains (Chanprasartsuk & Prakitchaiwattana, 2022; Karahan et al., 2011) Zhong (1996) คัดแยกสายพันธุ์ *G. xylinus* 323 จากน้ำมะพร้าวหมัก และนำมาใช้หมักน้ำมะพร้าว (Autochthonous strains) เพื่อผลิต BC ในระดับอุตสาหกรรมและพัฒนาจนเป็นหนึ่งในผู้ผลิต BC รายใหญ่ของโลก (Zhong, 2020)

## (2) ปริมาณออกซิเจน พื้นที่ผิวสัมผัสอากาศและปริมาตรน้ำหมัก

จากข้อมูลข้างต้นในหัวข้อ 2.1.1 *K. xylinus* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต และสร้าง Adenosine triphosphate (ATP) ในกรณีที่เพาะเลี้ยงในน้ำหมัก *K. xylinus* จะอาศัยออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักเพื่อการผลิต BC จนกระทั่งหมดไป ดังนั้นจึงมีเพียงเซลล์ที่อาศัย BC พยุ่งเซลล์ให้ลอยตัวที่ผิวหน้าอาหารสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ สามารถมีชีวิตรอดอยู่ต่อและผลิต BC ต่อไปได้ จะเห็นได้ว่า การผลิต BC ขึ้นกับปริมาณออกซิเจนที่เซลล์ได้รับ (Liu, Li, et al., 2018; Nagashima et al., 2016; Ruka et al., 2012) และเพื่อให้เซลล์ได้รับออกซิเจนในปริมาณที่เหมาะสมเพียงพอต่อการผลิต BC พื้นที่ผิวสัมผัสอากาศและปริมาตรของน้ำหมักจึงเป็นอีกปัจจัยที่ควรพิจารณามีรายงานว่าการผลิต BC ด้วย *A. xylinum* แปรผันโดยตรงกับอัตราส่วนพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศต่อปริมาตรของอาหารเหลว Krystynowicz et al. (2002) ศึกษาโดยแปรปริมาตรของอาหารเหลวในภาดพลาสติก บ่มด้วย *A. xylinum* E25 เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C พบว่า อัตราส่วนพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศต่อปริมาตรของอาหารเหลวเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น Cakar et al. (2014) ศึกษาโดยแปรปริมาตรและพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศของอาหารเหลวที่ใช้บ่ม *G. xylinus* เป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C พบแนวโน้มเช่นเดียวกัน

## (3) แหล่งคาร์บอน

กระบวนการผลิต BC ด้วย *K. xylinus* ใช้ UDP-glucose เป็นสารตั้งต้น กลไกการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนต่างๆ เป็นสารตั้งต้นข้างต้นต้องอาศัยเอนไซม์ที่ต่างกันออกไป ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีเอนไซม์แตกต่างกัน ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการผลิต BC แตกต่างกัน แม้ว่าเพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน ทำให้มีข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลายในการเพาะเลี้ยง *K. xylinus* เพื่อผลิต BC ดังตารางที่ 2.1 (Shah et al., 2013) ไม่ว่าจะเป็นน้ำตาลโมลเลกุลเดี่ยวและ/หรือน้ำตาลโมลเลกุลคู่และ/หรือแอลกอฮอล์ (Phruksaphithak et al., 2019) Mohammadkazemi et al. (2015) ทดลองเพาะเลี้ยง *G. xylinus* PTCC 1734 เพื่อผลิต BC เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 °C ที่ความเร็วรอบ 150 rpm ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ น้ำเชื่อม กลูโคส แมนนิทอล ซูโครส และซูโครสสำหรับอาหาร พบว่า แมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน

ที่ *G. xylinus* PTCC 1734 ให้ผลผลิต BC สูงที่สุด รองลงมาเป็นซูโครส นอกจากนี้ยังมีการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นๆ เป็นทางเลือก เพื่อลดต้นทุนการผลิต Beliah et al. (2020) พบว่าสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ที่สกัดจากสาหร่าย *Posidonia oceanica* เป็นแหล่งคาร์บอนทางเลือกแทนการใช้กลูโคสในการเพาะเลี้ยง *G. xylinus* ATCC 10245 เพื่อผลิต BC เป็นเวลา 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยที่แหล่งคาร์บอนทางเลือกน้ำตาลรีดิวซ์จากสาหร่ายให้ผลผลิต BC สูงกว่า

ตารางที่ 2.1 ความหลากหลายของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต BC ข้อมูลจาก Shah et al. (2013)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งอ้างอิง
<i>G. xylinus</i> , <i>Trichoderma reesei</i>	Glucose	Cavka et al. (2013)
<i>G. xylinus</i>	Glucose	Feng et al. (2012)
<i>G. xylinus</i> (PTCC, 1734)	Glucose	Moosavi and Yousefi (2011)
<i>G. xylinus</i> (ATCC 53524)	Sucrose	Mikkelsen et al. (2009)
<i>G. xylinus</i> (K3)	Mannitol	Nguyen et al. (2008)
<i>G. xylinus</i> (IFO 13773)	Sugar cane molasses	Keshk and Sameshima (2006)
<i>A. xylinum</i> (ATCC 700178)	CSL-Fru	Cheng et al. (2011)
<i>Gluconacetobacter</i> sp. (RKY5)	Glycerol	Kim et al. (2006)
<i>A. xylinum</i> (BPR2001)	Molasses	Bae and Shoda (2004)
<i>A. xylinum</i> (BPR2001)	Fructose	Bae et al. (2004)

## (4) แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเกี่ยวข้องกับกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ และโคเอนไซม์ จึงมีส่วนสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และการสร้างเซลล์ มีรายงานการใช้แหล่งไนโตรเจนอย่างหลากหลายในการผลิต BC ได้แก่ Yeast extract, Casein hydrolysate, Ammonium sulfate, Peptone, Sodium glutamate และ Glycine (Adnan et al., 2015; Çoban & Biyik, 2011; El-Salam, 2012; Lin et al., 2013; Mohammadkazemi et al., 2015)

## (5) สารชักนำการผลิต BC

เนื่องจากกระบวนการผลิต BC จากกลูโคสประกอบด้วยหลายขั้นตอน การเติมสารชักนำจะช่วยเร่งและ/หรือลดขั้นตอนเหล่านั้นลง ส่งผลให้มีส่วนช่วยในการส่งเสริมการผลิต BC ดังแสดงในตารางที่ 2.2 ตารางที่ 2.2 บทบาทของสารชักนำในกระบวนการผลิต BC ข้อมูลจาก Andriani et al. (2020)

สารชักนำ	บทบาท
Ethanol	- ส่งเสริมการสร้าง ATP ส่งผลให้ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ glucokinase และ fructokinase - ยับยั้งการกลายพันธุ์
Vitamins (oyridoxine, nicotinic acid, biotin, p-aminobenzoic acid)	- กระตุ้นการผลิต BC โดยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์
Ascorbic acid	- ลดการผลิตกรดกลูโคนิกด้วยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
Lignosulfonate	
Agar	- ชัดขวางการจับตัวของ BC ทำให้มีจำนวนเซลล์อิสระเพิ่มขึ้น ส่งเสริมการผลิต BC
Sodium alginate	
Lactate	- เพิ่มความเข้มข้นของ ATP ในเซลล์ ส่งเสริมการใช้แหล่งคาร์บอนผลิต BC
Ammonium dihydrogen phosphate	- กระตุ้นการผลิต BC โดยส่งเสริมการผลิตโคเอนไซม์

จากข้อมูลข้างต้น จะเห็นได้ว่า ในการผลิต BC นอกจากสายพันธุ์ และปริมาณออกซิเจนแล้ว จำเป็นต้องมีสารอาหารเพียงพอให้จุลินทรีย์ทั้งใช้ในการผลิต BC และเจริญมีชีวิตรอดได้ น้ำผลไม้จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เช่น น้ำสับปะรด



## 2.2 สับปะรด

สับปะรดเป็นผลไม้เขตร้อน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ananas comosus* (L.) Merr. อยู่ในวงศ์ *Bromilliaceae* มีแหล่งกำเนิดในเขตร้อนของทวีปอเมริกาใต้ ชาวพื้นเมืองเรียกผลไม้ชนิดนี้ว่า Nanas ต่อมาชาวโปรตุเกสจึงเรียกชื่อผลไม้ชนิดนี้ว่า Ananas ตามชาวพื้นเมืองและนำมาสู่แถบเอเชีย รวมถึงประเทศไทย คนไทยเรียกผลไม้ชนิดนี้ว่า “สับปะรด” เกิดจากคำว่า “สรรพรส” หมายถึง มีหลายรสทั้งรสหวานและรสเปรี้ยวในลูกเดียว สับปะรดถูกจำแนกตามเกณฑ์มาตรฐานด้วยลักษณะของรูปร่าง รูปทรง และรสชาติ ซึ่งกลุ่มพันธุ์สับปะรดที่นิยมปลูกเพื่อผลิตในเชิงการค้าในประเทศไทย มี 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 สเปนนิช (Spanish) ได้แก่ พันธุ์อินทรชิตแดง และพันธุ์อินทรชิตขาว สับปะรดกลุ่มพันธุ์นี้ใบมีหนามหลายรูปแบบ ผลรูปทรงกระบอก ผลดิบมีสีม่วงคล้ำเมื่อเริ่มสุกเปลี่ยนเป็นสีส้มสำหรับพันธุ์อินทรชิตแดง ผลดิบมีสีเขียวเมื่อเริ่มสุกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองสำหรับพันธุ์อินทรชิตขาว ขนาดผลเล็กกว่าพันธุ์ปัตตาเวีย รสหวาน ตาลึก ไม่เหมาะที่จะใช้บรรจุเป็นสับปะรดกระป๋อง

กลุ่มที่ 2 ควีน (Queen) ได้แก่ พันธุ์ภูเก็ท พันธุ์ภูแล และพันธุ์ตราดสีทอง สับปะรดกลุ่มพันธุ์นี้มีหนามรอบใบที่มีขนาดเล็ก ผลดิบมีสีเขียว และเริ่มสุกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองพร้อมกันทุกส่วนของผล ผลขนาดเล็ก เนื้อสีเหลืองทอง ตาลึก เส้นใยน้อยกว่าทุกพันธุ์ นิยมใช้ในการบริโภคสด

กลุ่มที่ 3 สมูทแคยีน (Smooth cayenne) ได้แก่ พันธุ์นางแล และพันธุ์ปัตตาเวีย สับปะรดกลุ่มพันธุ์นี้มีหนามเฉพาะปลายใบ ผลรูปวงรี มีขนาดปานกลาง ผลดิบมีสีเขียวเมื่อเริ่มสุกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจากฐานสู่ส่วนบนของผล ตาดีน เนื้อสีเหลืองอ่อน

สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ Smooth cayenne มีลักษณะทรงต้นใหญ่กว่าพันธุ์นางแลในกลุ่มพันธุ์เดียวกัน ใบสีเขียวเข้มผิวมัน ขอบใบเรียบมีหนามที่ปลาย ก้านผลสั้น ผลมีน้ำหนักประมาณ 2-6 กิโลกรัมต่อผล เนื้อผลสีเหลืองอ่อน รสหวาน มีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่มาก ตาดีน เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรม มีแหล่งปลูกใหญ่อยู่ในภาคตะวันตกของประเทศไทย (วิบูลย์ ทองภูศิริไพโร และสันติ ช่างเจรจา, 2557)

ผลสับปะรดอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ มีรายงานว่า ผลสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย 100 กรัม มีปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เยื่อใย คาร์โบไฮเดรต และพลังงาน เท่ากับ 87.24, 0.13, 0.55, 1.40, 11.82 กรัม และ 45 กิโลแคลอรี ตามลำดับ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินเอ รวมถึงแร่ธาตุต่างๆ เช่น ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม

โพแทสเซียม เหล็ก โซเดียม ทองแดง และสังกะสี นอกจากนี้ผลสับปะรดประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกในรูปแบบที่ถูกตรึงในเนื้อเยื่อสับปะรด ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซ์โดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ส่งผลให้เกิดสมบัติต้านอนุมูลอิสระในลำไส้ใหญ่ อาจช่วยป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ และผลสับปะรดประกอบด้วยสารเบต้าแคโรทีนมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ผ่านกระบวนการออกซิเดชัน พบมากในผักผลไม้ที่มีสีเหลืองและส้ม อีกทั้งผลสับปะรดยังประกอบด้วยเอนไซม์บรอมีเลน (bromelain) ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยโปรตีน ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกัน ท้านมะเร็งบางชนิด ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ช่วยย่อยอาหาร ลดอาการบวมและอาการอักเสบ (Mohd Ali et al., 2020; อรองจันทร์ประสาทรสุข, 2558; กฤติยา ไชยนอก; 2561; ปราณี อานเป็รื่อง, 2541)

ในอุตสาหกรรมอาหารแปรรูปของประเทศไทยมีมาตรฐานข้อกำหนดเฉพาะเรื่องขนาด (Size specification) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้กำหนดมาตรฐานผลสับปะรด เพื่อใช้แปรรูปเป็นสับปะรดกระป๋องไว้ดังนี้ เป็นสับปะรดสดทั้งผลไม่มีจุกและก้านสุกได้ที่ โดยกำหนดให้มีปริมาณเนื้อสับปะรดไม่น้อยกว่าร้อยละ 25 mg ต่อ 1 กิโลกรัมของน้ำหนักรวม ผลสับปะรดดังกล่าว แบ่งเป็น 2 ชั้นคุณภาพ คือ ชั้นหนึ่ง (Class I) เส้นผ่าศูนย์กลางผล 10.5-15.5 cm ชั้นสอง (Class II) เส้นผ่าศูนย์กลางผล 9.0-10.4 cm สับปะรดทั้งสองชั้นมีความยาวผลไม่น้อยกว่า เส้นผ่าศูนย์กลางผล (ชาญยุทธ กาฬกาญจน์, 2561)

น้ำสับปะรดสามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต BC ได้ มีรายงานการศึกษาการใช้ น้ำสับปะรดในการผลิต BC ได้แก่ Junsangsree et al. (2002) ได้ศึกษาการใช้ น้ำสับปะรดทดแทน น้ำมะพร้าวในการผลิต BC ให้เป็นวุ้นมะพร้าว-สับปะรด พบว่า ในการผลิต BC ของ *A. xylinum* ในระบบการหมักนี้ต้องเติม Dinucleotide-di-GMP เพื่อเป็นแหล่งฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบ ทั้งนี้ เนื่องจากเติมน้ำสับปะรดแทนที่น้ำมะพร้าวจะทำให้ปริมาณฟอสเฟตในอาหารเหลวลดลง ทำให้ขนาดของ BC ลดลง จากการทดลองอาหารเหลวสูตรดัดแปลงที่ให้ผลผลิตของวุ้นมะพร้าว-สับปะรดหนาที่สุด ประกอบด้วยน้ำสับปะรด 25 % (v/v) น้ำตาล 8 % (w/v) กรดแอสซิดิก 2 % (w/v) แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.6 % (w/v) แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำมะพร้าว บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 10 วัน เมื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 3.6 ให้ผลประเมินทางประสาธสัมพันธ์ด้านสีและกลิ่นสูงที่สุด

Nurtjahtja (2020) ได้พัฒนา Nata de pina ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักของ *A. xylinum* ในน้ำทิ้งจากการปอกเปลือกสับปะรด โดยการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และหมักภายใต้สภาวะควบคุม พบว่า สภาวะการหมักที่เหมาะสม คือ ปริมาณกล้าเชื้อ 40 % (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 29 °C เป็นเวลา 28 วัน ให้ผลผลิต BC ชนิด Nata de pina ที่มีปริมาณเส้นใยมากที่สุด

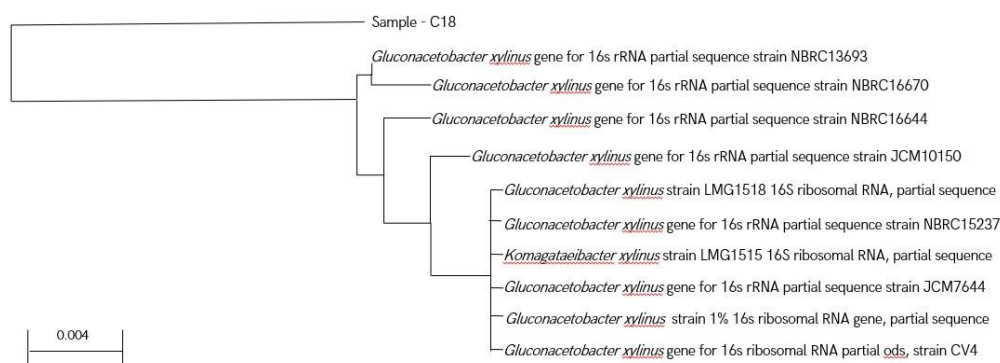
## 2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต BC สายพันธุ์จุลินทรีย์เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ควรนำมาพิจารณา จึงศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการคัดแยกแบคทีเรียผลิต BC เพื่อที่จะให้ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต BC ดังนี้

### 2.3.1 การคัดแยกแบคทีเรียผลิต BC

การคัดแยกแบคทีเรียผลิต BC ทำได้โดย Singh et al. (2017) นำของเสียมา 1 g จากอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ผลไม้ อ้อย และน้ำส้มสายชู เติมน้ำใน Hestrin-Schramm ที่ผสมไฮโคลเฮกซามีน-ไมด์ กำจัดการปนเปื้อนจากยีสต์รา บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 120-168 ชั่วโมง จะเกิดแผ่นวุ้นบริเวณพื้นผิวสัมผัสอากาศของอาหารเหลว นำแผ่นวุ้นไปเจือจางที่ความเข้มข้น  $10^{-7}$  เท่า ด้วย 0.9% (w/v) โซเดียมคลอไรด์ และทำให้จุลินทรีย์กระจายบนอาหารแข็ง GEY (Glucose, ethanol and yeast extract) ประกอบด้วย กลูโคส 2.0% สารสกัดจากยีสต์ 1.0% เอทานอล 5.0% แคลเซียมคาร์บอเนต 0.3% และผงวุ้น 2.0% บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกลูกโหลที่สร้าง Clear zone บนอาหารแข็ง

จากการศึกษาข้างต้น พบจุลินทรีย์ที่สร้าง Clear zone 34 ไอโซเลท เลือกลูกโหล 11 ไอโซเลท ตั้งชื่อสายพันธุ์ว่า C18 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 16s rRNA สายพันธุ์ C18 มีความคล้ายคลึงกับ *G. xylinus* 94% ดังภาพที่ 2.6 ดังนั้นไอโซเลทที่คัดแยกได้สามารถระบุได้ว่าเป็นสายพันธุ์ *G. xylinus*

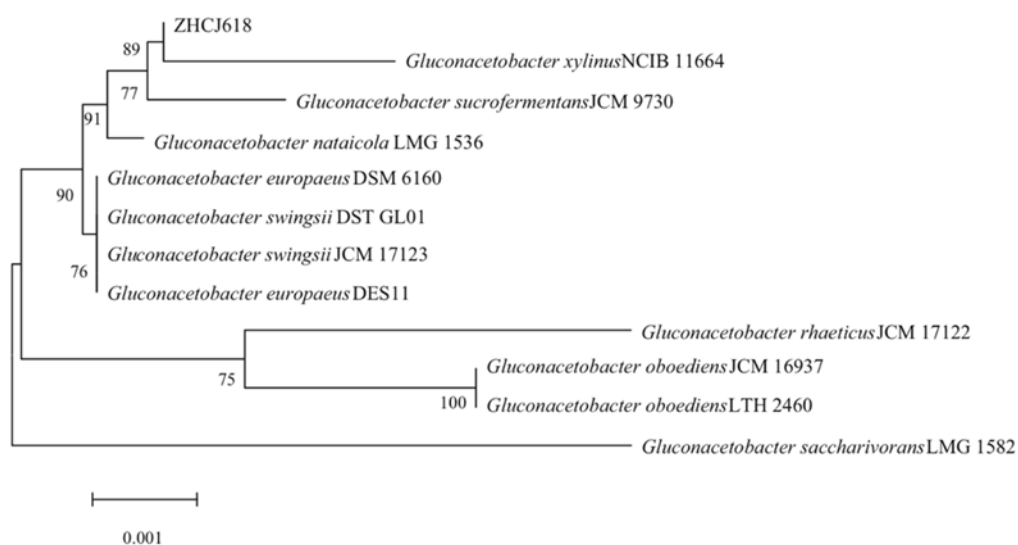


ภาพที่ 2.6 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของสายพันธุ์ C18

(Singh et al., 2017)

มีรายงานการคัดแยกจุลินทรีย์จากอาหาร คือ คอมบูชา โดย Zhang et al. (2018) ตีปั่น SCOBY ในน้ำเกลือและเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ก่อนเจือจางและนำไปซีดลงบนอาหารแข็งประกอบด้วย ซูโครส 5 g/l สารสกัดจากเนื้อ 1.5 g/l ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

0.44 g/l กรดซิตริก 0.08 g/l ผงวุ้น 1.8 g/l และเอทานอล 1 ml/l pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากการศึกษาข้างต้น พบจุลินทรีย์ที่สร้าง Clear zone 34 ไอโซเลท เลือก 11 ไอโซเลท ตั้งชื่อสายพันธุ์ว่า ZHCJ618 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 16s rRNA สายพันธุ์ ZHCJ618 มีความคล้ายคลึงกับ *G. xylinus* NCIB 11664 99% ดังภาพที่ 2.7 ดังนั้นไอโซเลทที่คัดแยกได้สามารถระบุได้ว่าเป็นสายพันธุ์ *G. xylinus*



ภาพที่ 2.7 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ของสายพันธุ์ ZHCJ618 (Zhang et al., 2018)

### 2.3.2 การเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกในน้ำผลไม้

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ให้นิยามของ จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotics) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 346 พ.ศ. 2554 ว่า “จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้เกิดผลที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ และมีปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตอยู่ คงเหลืออยู่ไม่น้อยกว่า  $10^6$  CFU ต่ออาหาร 1 กรัม ตลอดอายุการเก็บรักษาของอาหารนั้น” อย่างไรก็ตามประโยชน์ของโพรไบโอติกนั้นขึ้นกับการมีชีวิตรอดในทางเดินอาหาร ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเพื่อให้โพรไบโอติกมีชีวิตรอดและทำหน้าที่ได้ จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ควรพิจารณา มีรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกในน้ำผลไม้ ได้แก่

น้ำสับปะรดสามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้ โดย Nguyen et al. (2019) รายงานว่า *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* เจริญได้ดีในน้ำสับปะรด (pH 6.7) โดยไม่ต้อง

เติมสารอาหารเพิ่ม งานวิจัยนี้ศึกษาการหมัก *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ในน้ำสับปะรด และอายุการเก็บ พบว่า ฟรักโทสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพ และภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 เดือน ในเดือนแรกประชากรจุลินทรีย์ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเวลาผ่านไป 2 เดือน จุลินทรีย์โพรไบโอติกลดลงเพียง 0.11 log CFU/ml เป็นแนวทางในการพัฒนาเครื่องดื่มน้ำสับปะรดโพรไบโอติก

Vatakit et al. (2017) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการช็อคด้วยกรด ได้แก่ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 และเชื้อผสมอัตราส่วน 1:1 ร่วมกับตรึงเซลล์บนวุ้นที่เกิดจากการหมักด้วย *A. xylinum* TISTR 893 ในน้ำสับปะรดที่ปรับค่า pH 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเหลือรอดของเซลล์ด้วยวิธีเทเพลทด้วย MRS agar พบว่า การเหลือรอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการช็อคด้วยกรดร่วมกับการตรึงเซลล์ด้วยเซลล์โลสมิ่จำนวนเหลือรอดสูงสุดเท่ากับ 7.77 log CFU/ml โดยผลิตภัณฑ์น้ำสับปะรดเสริมโพรไบโอติกด้วยวิธีดังกล่าวมีคะแนนความชอบโดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 7.92

Wang et al. (2022) ทดลองเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกทางการค้า 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* 85 (La85), *Lactobacillus helveticus* 76 (Lh76) และ *Lactobacillus plantarum* 90 (Lp90) ในน้ำกีวี 2 สายพันธุ์ ปรับค่า pH เป็น 4.0 และปรับน้ำตาลเป็น 12.0 °Brix บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ บ่งชี้ได้ว่า *L. plantarum* สามารถเจริญในน้ำผลไม้ที่เป็นกรด เช่น น้ำกีวี ได้ดี มีอัตราการรอดสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ที่รายงานก่อนหน้านี้ โดยมีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดมากกว่า 9 log CFU/ml จึงสามารถใช้เป็นแนวทางหนึ่งในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกสำหรับใช้ในการผลิตน้ำผลไม้โพรไบโอติกอย่างจำเพาะได้

## บทที่ 3

### การดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 จุลินทรีย์สายพันธุ์มาตรฐาน จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °C

- *Gluconacetobacter xylinus* TISTR 1064 (ATCC 23767)
- *Komagataeibacter xylinus* TISTR 086
- *Komagataeibacter xylinus* TISTR 428
- *Komagataeibacter xylinus* TISTR 1061

#### 3.1.2 วัตถุดิบ

- สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย จากจังหวัดนครพนม ระยะสุกที่ 2 สุกจัด ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการการพัฒนาและประเมินผลของการบริโภคเจลลีนัทตาโพรไบโอติกที่ส่งเสริมสุขภาพทางจิตใจของผู้สูงวัยจากน้ำสับปะรด
- น้ำหมักสมุนไพรที่มีส่วนผสมของสับปะรด อายุ 8 ปี, 5 ปี และ 10 เดือน จากการหมักในครัวเรือน จังหวัดมหาสารคามและกรุงเทพฯ เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 °C
- จุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* FTCU10621 ซึ่งเป็น Probiotic candidate สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากน้ำสับปะรด (Autochthonous) โดยภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 3.1.3 อุปกรณ์

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance, Metter Toledo Kogyo, SX-700, Japan)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance, Metter Toledo Kogyo, SX-700, Japan)
- เครื่องไมโครเวฟ (Microwave, LG MS2127CW, Thailand)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอ (Autoclave, Tommy SX-700, USA)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, LAQUAtwin-pH-22, Horiba, Japan)
- เครื่องตีปั่น (Stomacher, Seward, England)
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer, Vortex-2 Genie, USA)
- เครื่องเขย่า (Shaker, Witeg, Germany)

- เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer, TA-XT2i, Stable Micro Systems, England)
- เครื่องวัดสี (Chroma meter, Konica Minolta model, CR-400, Japan)
- เครื่องวัดความชื้น (Mettler Toledo, HB43-S, Switzerland)
- เครื่องวัด Water activity (Water activity meter, Aqualab 4, Meter group, USA)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (BioSpectrometer, Eppendorf, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge, Micro22R Hettich, Germany)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler, BIO-RAD T100™, Singapore)
- เครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer, Scientific promotion, Thailand)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator, Memmert, Germany)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet Class II, Telstar Bioultra, USA)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, WTB Binder FD 115, Germany)
- ตู้เย็น (Refrigerator, Mitsubishi, Thailand)
- ตู้แช่แข็ง (Deep freezer, Sanyo, Biomedical freezer, Japan-Thailand)

#### 3.1.4 สารเคมี

- Sucrose (Kemaus, Australia)
- Sodium dihydrogen phosphate (Kemaus, Australia)
- 95% ethyl alcohol (Merck, USA)
- Acetic acid (Loba chemie, India)
- Phenolphthalein (Merck, USA)
- Sodium hydroxide (Kemaus, Australia)
- Sodium chloride (Kemaus, Australia- Sodium carbonate (Kemaus, Australia)
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Germany)

#### 3.1.5 สารเคมีงานอณูชีววิทยา

- GF-1 Bacteria DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia)
- Buffer (Vivantis, Malaysia)
- DNA Tag polymerase (Vivantis, Malaysia)
- dNTPs (Vivantis, Malaysia)

- Ethidium bromide (Applichem, Spain)
- Ladder (Vivantis, Malaysia)
- Magnesium Chloride (Vivantis, Malaysia)
- DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia)

### 3.1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Nutrient Agar (Himedia laboratories, India)
- Peptone (Himedia laboratories, India)
- Yeast extract (Himedia laboratories, India)
- Agar powder (Himedia laboratories, India)
- MRS agar (Himedia laboratories, India)
- Yeast malt agar (Himedia laboratories, India)

### 3.1.7 การเตรียมน้ำสับปะรด

#### 3.1.7.1 น้ำสับปะรดคั้นสด

สับปะรดปัดตาเวีย 10 กิโลกรัม ล้างทำความสะอาดสับปะรดทั้งผล ปอกเปลือกและหั่นสับปะรดเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อนำไปคั้นน้ำด้วยเครื่องคั้นน้ำแบบอัดเกลียวได้น้ำสับปะรดคั้นสด 5 กิโลกรัม บรรจุใส่ถุงรีทอร์ทเพ้าซ์ ปิดผนึกตรวจสอบรอยรั่ว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อนำไปใช้ในการทดลองจะตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งละลายเป็นของเหลวสมบูรณ์

#### 3.1.7.2 น้ำสับปะรดพาสเจอร์ไรซ์ เตรียมโดยโรงงานต้นแบบแปรรูปอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สับปะรดปัดตาเวีย 314 กิโลกรัม ล้างทำความสะอาดสับปะรดทั้งผล ปอกเปลือกและหั่นสับปะรดเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อนำไปคั้นน้ำด้วยเครื่องคั้นน้ำแบบอัดเกลียวได้น้ำสับปะรดคั้นสด 148 กิโลกรัม พาสเจอร์ไรซ์น้ำสับปะรดที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 วินาที กรองใส่หม้อควบคุมอุณหภูมิ ได้น้ำสับปะรดพาสเจอร์ไรส์ 132 กิโลกรัม บรรจุใส่ถุงรีทอร์ทเพ้าซ์ ปิดผนึกตรวจสอบรอยรั่วและทำให้เย็นทันที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อนำไปใช้ในการทดลองจะตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งละลายเป็นของเหลวสมบูรณ์



### 3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.2.1 ประเมินการผลิต BC ในน้ำสับปรดด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

##### 3.2.1.1 ประเมินการผลิต BC ในน้ำสับปรดด้วยแบคทีเรีย

ประเมินสภาวะการหมักน้ำสับปรดด้วยแบคทีเรียสร้างเซลลูโลส ด้วยสายพันธุ์มาตรฐาน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *K. xylinus* TISTR428, *G. xylinus* TISTR 1064, *K. xylinus* TISTR 086 และ *K. xylinus* TISTR 1061

เตรียมกล้าเชื้อโดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเหลว Glucose yeast extract broth (GYEB) 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 200 rpm

เตรียมน้ำสับปรดที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ 100 ml และเติม 0.6% แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้ 4.0 ดัดแปลงจาก Junsangsree et al. (2002) บ่มเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดปริมาณ BC (g/L) และติดตามสมบัติทางเคมีกายภาพของน้ำหมักทุก 48 ชั่วโมง ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total soluble solid, TSS) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable acidity, TA) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์มาตรฐานที่เหมาะสมในการผลิต BC ในน้ำสับปรด

##### 3.2.1.2 ประเมินผลของอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวกับปริมาตรต่อการผลิต BC ในน้ำสับปรด

แบคทีเรียผลิตเซลลูโลสเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีอากาศ หรือมีออกซิเจน (Obligate aerobe) มักพบเจริญบริเวณผิวหน้าของน้ำหมัก ดังนั้นพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศและปริมาตรของน้ำหมักจึงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่ควรพิจารณา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต BC การทดลองนี้ แปรพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศภาชนะหมัก (15.6, 24.6, 26.0, 42.0, 64.3 และ 128.0 cm<sup>2</sup>) ทำภาชนะหมักให้ปลอดเชื้อด้วยรังสียูวีเป็นเวลา 30 นาที ก่อนแปรปริมาตรของน้ำหมัก ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นเติมกล้าเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่คัดเลือกจาก ข้อ 2.1.1 10 % (v/v) บ่มเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดปริมาณ BC ที่ได้ และคำนวณ BC yield (%) ดังสมการ (1)

$$\text{BC yield (\%)} = \frac{\text{ปริมาตร BC (cm}^3\text{)}}{\text{ปริมาตรน้ำหมัก (cm}^3\text{)}} \times 100 \quad (1)$$

สร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง BC yield (y) กับอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศและปริมาตร (x) และวิเคราะห์สมการถดถอยด้วยโปรแกรม Microsoft excel

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศและปริมาตรน้ำหมัก

พื้นที่ผิวสัมผัสอากาศ (cm <sup>2</sup> )	ปริมาตรน้ำหมัก (cm <sup>3</sup> )	อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัส อากาศและปริมาตรน้ำหมัก (cm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup> )
64.3	150.0	0.43
24.6	50.0	0.49
15.6	25.0	0.62
64.3	100.0	0.64
26.0	25.0	1.04
64.3	50.0	1.29
42.0	25.0	1.68
128.0	25.0	5.12

### 3.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Bacterial Cellulose (BC) ในน้ำสับประรด

#### 3.2.2.1 แหล่งคัดเลือกจุลินทรีย์และระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้าง BC

คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้าง BC จากน้ำหมักสมุนไพร อายุ 8 ปี, 5 ปี และ 10 เดือน 2 รูปแบบ ได้แก่ คัดแยกโดยตรงจากน้ำหมักสมุนไพร และคัดแยกโดยการ Pre-enrichment 4 ชนิด ได้แก่ น้ำสับประรดคั้นสดเต็มส่วน น้ำสับประรดคั้นสดเต็ม แอลกอฮอล์ 2 % (v/v) น้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์เต็มส่วน และน้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์เต็ม แอลกอฮอล์ 2 % (v/v) คัดแยกจุลินทรีย์จากทั้ง 2 รูปแบบ โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ NA และ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 วัน Glucose yeast extract agar (GYEA) และ YMA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี และคัดแยกจุลินทรีย์ โดยใช้เทคนิคทางสถิติด้วยวิธี Harrison's disc (Harrigan, 1998) และนำมาชิตบนอาหารวุ้นแข็งเพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีสมบัติการสร้าง BC ในน้ำสับประรด โดยเฉพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในน้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์

ปริมาตร 10 ml ในหลอดทดลองแก้ว ขนาด 15 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เลือก จุลินทรีย์ที่ผลิตสารคล้าย BC (Bacterial cellulose-like substance) บนผิวหน้าของ น้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาไอโซเลทใน Glycerol stock โดยเฉพาะเลี้ยงใน GYEB บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2-3 วัน ที่ 200 rpm แบ่งหัวเชื้อปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้า กันกับ 100% glycerol ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่ -40 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

ระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ โดยลากจุลินทรีย์ไอโซเลทจาก Glycerol stock บน GYEA บ่มเป็นเวลา 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำโคลนมาสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด GF-1 Bacteria DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 16s ribosomal DNA/RNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) (วิธีการแสดงในภาคผนวก ก.) ส่งไปทำ sequence ที่บริษัท แอปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้กับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST (Basic local alignment search tools) เพื่อ ตรวจสอบร้อยละของความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้กับ จุลินทรีย์ในฐานข้อมูลดังกล่าว (% identity) และนำมาประกอบการระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ คัดเลือกได้

### 3.2.2.2 ศึกษาสภาวะการหมักน้ำสับประรดด้วยไอโซเลท

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลทที่คัดเลือกในน้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์ภายใต้สภาวะที่ ประเมินได้จาก 3.2.1 และ แปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (A) คือ ซูโครส (3 ระดับ) ปริมาณ แหล่งไนโตรเจน (B) คือ เพปโตน (2 ระดับ) และปริมาณสารชักนำ (C) คือ โซเดียมได-ไฮโดรเจนฟอสเฟต หรือ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (2 ระดับ) โดยออกแบบแผนการทดลองแบบ 3x2x2 แฟคทอเรียล ดังตารางที่ 3.2 ปรับน้ำหมักให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 4.0 ก่อนการหมักด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ บ่มเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง เตรียมกล้าเชื้อ ไอโซเลทสายพันธุ์อโตโคเนสที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.2.1 โดยเชื้อโคลนจาก Glycerol stock ลากบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ GYEA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น เชื้อโคลนลงในสารละลายน้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์เข้มข้น 1% (v/v) ผสมซูโครส 1% (w/v) เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อไอโซเลท หมักที่ปริมาตรรวม 50 ml จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น 6 log CFU/ml ในขวดแก้วปลอดเชื้อ

ขนาด 150 ml ป่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของ BC และน้ำสับปะรดหลังหมัก เพื่อคัดเลือกสภาวะการหมักที่ผลิต BC ได้มากที่สุด

ตารางที่ 3.2 การแปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (A) คือ ซูโครส (3 ระดับ) ปริมาณแหล่งไนโตรเจน (B) คือ เพป्टอน (2 ระดับ) และปริมาณสารชักนำ (C) คือ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต หรือ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (2 ระดับ) ในน้ำสับปะรด โดยออกแบบแผนการทดลองแบบ  $3 \times 2 \times 2$  แฟคทอเรียล

รหัสตัวอย่าง	การเตรียมตัวอย่าง		
111	5% (w/v) sucrose ( $a_1$ )	0% (w/v) peptone ( $b_1$ )	0% (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $c_1$ )
112	5% (w/v) sucrose ( $a_1$ )	0% (w/v) peptone ( $b_1$ )	0.4% (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $c_2$ )
121	5% (w/v) sucrose ( $a_1$ )	0.5% (w/v) peptone ( $b_2$ )	0% (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $c_1$ )
122	5% (w/v) sucrose ( $a_1$ )	0.5% (w/v) peptone ( $b_2$ )	0.4% (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $c_2$ )
211	10% (w/v) sucrose ( $a_2$ )	0% (w/v) peptone ( $b_1$ )	0% (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $c_1$ )
212	10% (w/v) sucrose ( $a_2$ )	0% (w/v) peptone ( $b_1$ )	0.4% (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $c_2$ )
221	10% (w/v) sucrose ( $a_2$ )	0.5% (w/v) peptone ( $b_2$ )	0% (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $c_1$ )
222	10% (w/v) sucrose ( $a_2$ )	0.5% (w/v) peptone ( $b_2$ )	0.4% (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $c_2$ )
311	15% (w/v) sucrose ( $a_3$ )	0% (w/v) peptone ( $b_1$ )	0% (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $c_1$ )
312	15% (w/v) sucrose ( $a_3$ )	0% (w/v) peptone ( $b_1$ )	0.4% (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $c_2$ )
321	15% (w/v) sucrose ( $a_3$ )	0.5% (w/v) peptone ( $b_2$ )	0% (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $c_1$ )
322	15% (w/v) sucrose ( $a_3$ )	0.5% (w/v) peptone ( $b_2$ )	0.4% (w/v) $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ( $c_2$ )

- ศึกษาสมบัติ BC

นำ BC ภายหลังการหมักจากข้อ 3.2.2.2 มาวิเคราะห์จำนวนประชากรจุลินทรีย์ (log CFU/g) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ GYEA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง น้ำหนักเปียก (g/L) ค่าความชื้น (%) ค่า Water activity วัดค่าสี ค่าเนื้อสัมผัสด้วยโปรแกรมตัดแปลงจากวิธีของ Jagannath et al. (2011) โดยกดขึ้น BC ที่ 40% Strain ของความสูงปกติด้วยหัววัดรหัส P/100 เส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mm ที่ความเร็ว Pretest, Test และ Post test เท่ากับ 1, 0.5 และ 0.5 mm/s ตามลำดับ

- ศึกษาสมบัติของน้ำสับประรดหลังหมัก

นำน้ำสับประรดหลังหมักจากข้อ 3.2.2.2 มาวิเคราะห์จำนวนประชากรจุลินทรีย์ (log CFU/ml) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ GYEA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงก่อนนำมาวัด pH, TSS, TA ((AOAC), 2000) ปริมาณสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ตัดแปลงจากวิธีของ Shimada et al. (1992) (วิธีการแสดงในภาคผนวก ข.) และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ตัดแปลงจากวิธีของ Waterhouse (2002) (วิธีการแสดงในภาคผนวก ข.) จำแนกชนิดน้ำตาลและกรดอินทรีย์ในน้ำสับประรดหลังหมักด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้สารมาตรฐาน น้ำตาล ได้แก่ ฟรักโทส กลูโคส และซูโครส กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแอสติก กรดซิตริก กรดมาลิก กรดซัคซินิก และกรดแลคติก โดยส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกร่วมกับการสร้าง BC ด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์อโตโคเนส ในน้ำสับประรดตากเกรด

เตรียมน้ำสับประรดเพื่อผลิต BC ด้วยกระบวนการที่ประเมินได้จากข้อ 3.2.2.2 และเตรียมกล้าเชื้อไอโซเลทสายพันธุ์อโตโคเนสที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.2.1 โดยเชื้อโคลนิจาก Glycerol stock ลากบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ GYEA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อโคลนิจากในสารละลายน้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์เข้มข้น 1% (v/v) ผสมซูโครส 1% (w/v) เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อไอโซเลท และเตรียมกล้าเชื้อโพรไบโอติก โดยเชื้อโคลนิจาก Glycerol stock ลากบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อโคลนิจากในสารละลายน้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์

เข้มข้น 1% (v/v) ผสมซูโครส 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อ โพรไบโอติก

หมักไอโซเลทสายพันธุ์อโตโคนัสที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.2.1 ร่วมกับโพรไบโอติก ในน้ำสับปรดเพื่อผลิต BC ด้วยกระบวนการที่ประเมินได้จากข้อ 3.2.2.2 ปริมาตรรวม 50 ml จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นสายพันธุ์ละ 6 log CFU/ml ในขวดแก้วปลอดเชื้อ ขนาด 150 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ประเมินสมบัติการหมักโดย

ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของ BC ที่ได้ โดยนำ BC ภายหลังกการหมักจากข้อ 3.2.3 มาวิเคราะห์จำนวนประชากรจุลินทรีย์ไอโซเลท (log CFU/g) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ GYEA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนโพรไบโอติกที่มีชีวิตใน BC และน้ำหมักด้วยวิธีเทเพลทด้วย MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเปียก (g/L) วัดค่าสี FTIR analysis ดัดแปลงจากวิธีของ Johari et al. (2012) หองศ์ประกอบทางโครงสร้างเคมีโดยใช้ความยาวคลื่นอินฟราเรดช่วง 500-4,000  $\text{cm}^{-1}$  และ Scanning electron microscope (SEM) ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Scientific and technological research equipment center, STREC)

ศึกษาสมบัติของน้ำสับปรดหลังหมัก โดยนำน้ำสับปรดหลังหมักจากข้อ 3.2.3 มาวิเคราะห์จำนวนประชากรจุลินทรีย์ (log CFU/ml) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ GYEA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนโพรไบโอติกที่มีชีวิตใน BC และน้ำหมักด้วยวิธีเทเพลทด้วย MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำน้ำสับปรดหลังหมักมาปั่นเหวี่ยงก่อนนำมาวัด pH, TSS, TA ปริมาณสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ดัดแปลงจากวิธีของ Shimada et al. (1992) และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ดัดแปลงจากวิธีของ Waterhouse (2002) จากนั้นแบ่งน้ำสับปรด ที่ปั่นเหวี่ยงแล้วมาจำแนกชนิดขององค์ประกอบในน้ำสับปรดหลังหมักด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ดังที่กล่าวในหัวข้อ 3.2.2.2

### 3.2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การดำเนินการวิจัยโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ ) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistic version 22

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ประเมินการผลิต BC ในน้ำสับปรดด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

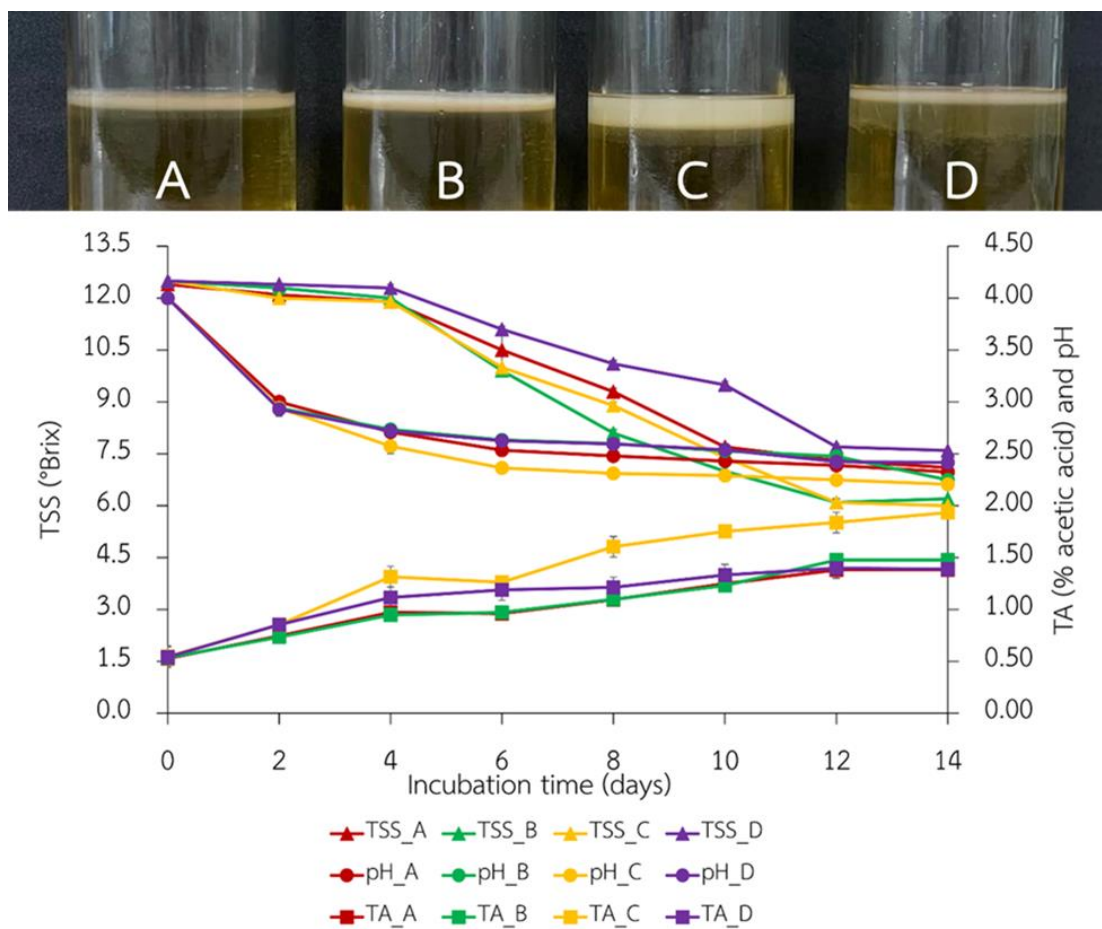
##### 4.1.1 ประเมินการผลิต BC ในน้ำสับปรดด้วยแบคทีเรีย

*A. xylinum* ได้รับอนุญาตโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2564) ให้เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้เพื่อผลิตวุ้นสวรรค์ (Nata de coco) ได้ โดยทั่วไปการผลิต BC ในรูปแบบวุ้นสวรรค์นี้ใช้น้ำมะพร้าวเป็นน้ำหมัก เมื่อพิจารณากระบวนการหมักเพื่อผลิต BC ด้วยแบคทีเรียกรดแอซิดิก *A. xylinum* (หรือเรียกว่า *G. xylinus* หรือ *K. xylinus*) อาศัยแหล่งคาร์บอน เพื่อการเจริญและสังเคราะห์ UDP-glucose สำหรับเป็นสารตั้งต้นผลิต BC อีกทั้งยังเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียชอบสภาวะกรด (Çoban & Biyik, 2011; Raiszadeh-Jahromi et al., 2020; Römling & Galperin, 2015) จึงมีความเป็นไปได้ว่า น้ำสับปรดจากสับปรดตกเกรดสามารถใช้เป็นน้ำหมักเพื่อผลิต BC ได้ งานวิจัยนี้จึงประเมินการผลิต BC ในน้ำสับปรดด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *K. xylinus* TISTR428, *G. xylinus* TISTR 1064, *K. xylinus* TISTR 086 และ *K. xylinus* TISTR 1061 บ่มเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า น้ำสับปรดพาสเจอร์ไรส์สามารถใช้เป็นน้ำหมักเพื่อผลิต BC ด้วยแบคทีเรีย สายพันธุ์มาตรฐานได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีพีโนไทป์หรือการแสดงออกและ/หรือตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นผลให้แบคทีเรียผลิต BC สายพันธุ์มาตรฐานแสดงสมบัติแตกต่างกันภายใต้การหมักในน้ำสับปรดที่สภาวะเดียวกัน ปริมาณ BC ที่แบคทีเรียผลิตเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น

เมื่อสิ้นสุดการหมักน้ำหนักเปียกของ BC ที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ดังตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นความจำเพาะของสายพันธุ์ต่อการสร้าง BC ในน้ำสับปรด โดยพบว่า BC ที่ผลิตด้วยแบคทีเรียมาตรฐานสายพันธุ์ TISTR428 (A), TISTR 1064 (B), TISTR 086 (C) และ TISTR 1061 (D) มีน้ำหนักเปียกเท่ากับ  $38.20 \pm 0.08$ ,  $57.00 \pm 0.07$ ,  $105.10 \pm 0.08$  และ  $33.40 \pm 0.05$  g/L ตามลำดับ โดยพบว่า สายพันธุ์ TISTR 428 (C) มีน้ำหนักเปียกของ BC มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่เมื่อสิ้นสุดการหมักสมบัติของน้ำสับปรดหมักไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) อย่างไรก็ตามพบว่า การเปลี่ยนแปลงของค่า TSS, TA และ pH ของน้ำสับปรดระหว่างการหมักด้วยแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน นั่นคือ ในช่วงระยะเวลาการหมัก 0 วันถึง 12 วัน น้ำหมักมีค่า TSS และ pH ลดลง ค่า TA เพิ่มขึ้น

และหลังจากนั้น คงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก เมื่อพิจารณาสมบัติของน้ำหมักภายหลังการหมักด้วย  
 แบคทีเรียสายพันธุ์ TISTR428 (A), TISTR 1064 (B), TISTR 086 (C) และ TISTR 1061 (D) พบว่า มี  
 ค่า TSS เท่ากับ  $7.1\pm 0.1$ ,  $6.2\pm 0.0$ ,  $6.0\pm 0.0$  และ  $7.6\pm 0.0$  °Brix ตามลำดับ มีค่า pH เท่ากับ  
 $2.33\pm 0.03$ ,  $2.25\pm 0.01$ ,  $2.21\pm 0.00$  และ  $2.42\pm 0.02$  และมีค่า TA เท่ากับ  $1.38\pm 0.01$ ,  $1.48\pm 0.01$ ,  
 $1.93\pm 0.01$  และ  $1.39\pm 0.01$  % Acetic acid ตามลำดับ โดยพบว่า สายพันธุ์ TISTR 428 (C) มีค่า  
 TSS ต่ำที่สุด ในขณะที่ค่า TA สูงที่สุด บ่งชี้ว่า สายพันธุ์นี้สามารถใช้น้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์เป็น  
 แหล่งคาร์บอนได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากแหล่งคาร์บอนจะถูกเซลล์นำมาใช้ผลิต BC แล้วแหล่ง  
 คาร์บอนในน้ำสับประรดถูกออกซิไดซ์เปลี่ยนเป็นกรดแอซิดิกด้วยกระบวนการ Oxidative  
 fermentation โดยเอนไซม์ที่เยื่อหุ้มเซลล์เร่งปฏิกิริยาในฝั่งของเพอริพลาสซึม (Periplasm) ทำให้  
 กรดแอซิดิกที่ได้จากการออกซิไดซ์ถูกขับออกนอกเซลล์และสะสมอยู่ในน้ำหมัก (ณัฐสรวัลย์ สายชนะ,  
 2558) จากประสิทธิภาพในการสร้าง BC ในน้ำสับประรดจึงเลือกสายพันธุ์ TISTR 428 (C) ไปศึกษาผล  
 ของอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศและปริมาตรต่อการผลิต BC ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์  
 มาตรฐานต่อไป





ภาพที่ 4.1 สมบัติของน้ำหมักในการผลิต BC ของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ (A) *G. xylinus* TISTR 1064, (B) *K. xylinus* TISTR 086, (C) *K. xylinus* TISTR 428 และ (D) *K. xylinus* TISTR 1061

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเปียกของ BC (g/L) ภายหลังกการหมัก

สายพันธุ์แบคทีเรียผลิต BC มาตรฐาน	น้ำหนักเปียกของ BC (g/L)
(A) <i>G. xylinus</i> TISTR 1064	38.20±0.08 <sup>c</sup>
(B) <i>K. xylinus</i> TISTR 086	57.00±0.07 <sup>b</sup>
(C) <i>K. xylinus</i> TISTR 428	105.10±0.08 <sup>a</sup>
(D) <i>K. xylinus</i> TISTR 1061	33.40±0.05 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> Values with the different superscript letters in the same column show significant differences ( $p < 0.05$ )

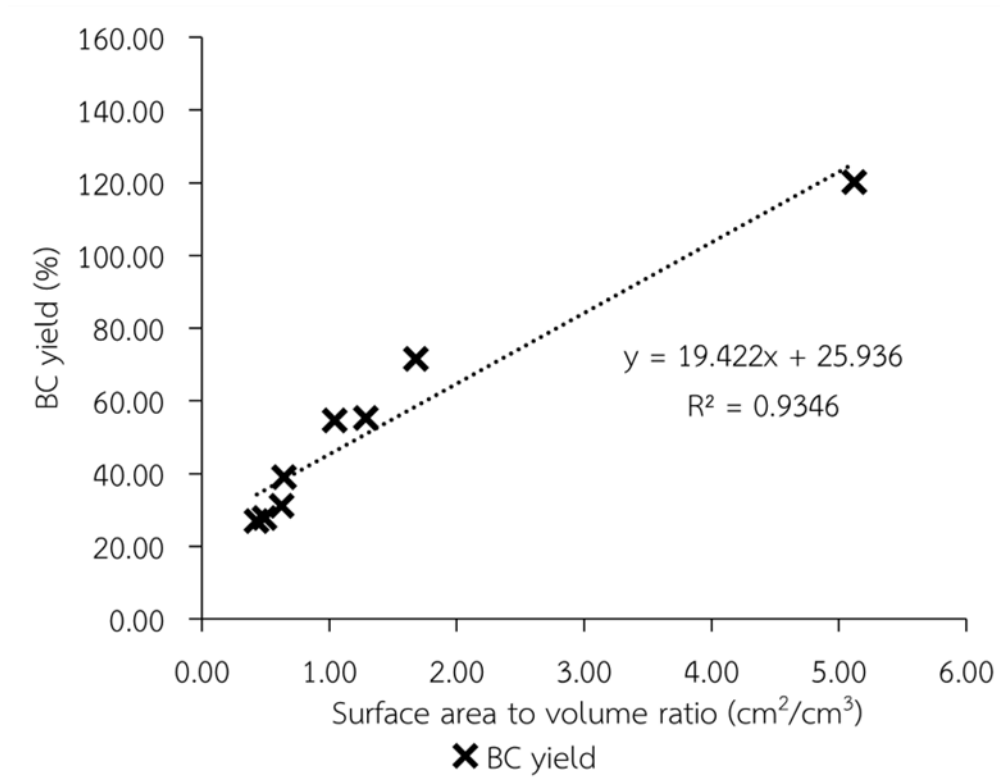
#### 4.1.2 ประเมินผลของอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวกับปริมาตรต่อการผลิต BC ในน้ำสับปะรด

ปัจจัยที่จำเป็นต่อกระบวนการผลิต BC ด้วยแบคทีเรีย *K. xylinus* ที่สำคัญอีกหนึ่งปัจจัย คือ ปริมาณออกซิเจน เนื่องจาก *K. xylinus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน เท่านั้น (Obligate aerobic bacterium) เพื่อให้การผลิต BC มีประสิทธิภาพสูงที่สุด (Çoban & Biyik, 2011) งานวิจัยนี้จึงประเมินผลของอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวกับปริมาตรต่อการผลิต BC ในน้ำสับปะรด เพื่อให้เซลล์ได้รับปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมเพียงพอต่อการผลิต BC โดยแปร รูปทรงภาชนะ (ทรงสี่เหลี่ยม และทรงกระบอก) พื้นที่ผิวสัมผัสอากาศภาชนะหมัก (15.6, 24.6, 26.0, 42.0, 64.3 และ 128.0 cm<sup>2</sup>) และแปรปริมาตรของน้ำหมักสับปะรด (25, 50, 100 และ 150 cm<sup>3</sup>) ปรับค่า pH เท่ากับ 4.0 ก่อนการหมัก และเติมแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (0.6 % (w/v)) เป็น สารชักนำการทำงานของเอนไซม์ Cellulose synthase (Junsangsree et al., 2002) จากนั้น เพาะเลี้ยง *K. xylinus* TISTR 428 บ่มเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสิ้นสุดการหมักวัด ปริมาตร BC ที่ TISTR 428 ผลิตได้ในแต่ละภาชนะ และคำนวณเป็น BC yield (%) (ตารางที่ 4.2) นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง BC yield (y) กับอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัส อากาศและปริมาตร (x) ดังภาพที่ 4.2 ค่า BC yield (y) มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับอัตราส่วน ระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศต่อปริมาตรน้ำหมัก (x) ดังสมการ  $y = 19.422x + 25.936$  ( $R^2 = 0.9346$ ) เมื่ออัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศต่อปริมาตรของน้ำหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณ BC เพิ่มขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ผลิต BC เป็นแบคทีเรียชนิดใช้ออกซิเจนในการเจริญ เมื่อออกซิเจนใน น้ำหมักหมดไป แบคทีเรียสร้าง BC หุ้มเซลล์และลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำหมักเพื่อรับออกซิเจน เมื่อน้ำหมัก มีพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศมาก แบคทีเรียจึงได้รับปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการเจริญเพิ่มมากขึ้นด้วย (Cakar et al., 2014; Krystynowicz et al., 2002)

เมื่อพิจารณาผลของรูปทรงภาชนะทรงสี่เหลี่ยมและทรงกระบอกที่อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิว กับปริมาตรใกล้เคียงกัน (0.43 และ 0.49 ตามลำดับ) พบว่า ภาชนะรูปทรงสี่เหลี่ยมให้ BC yield (%) ปริมาณมากกว่ารูปทรงกระบอก ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างของ ความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียผลิต BC กับภาชนะ ดังนั้นรูปทรงของภาชนะที่แตกต่างกัน จึงส่งผลต่อการรวมตัวสร้างโครงสร้างสามมิติของเส้นใย BC ที่แตกต่างกัน (Caro-Astorga et al., 2021)

เมื่อนำ BC ที่ TISTR 428 ผลิตได้ในแต่ละภาชนะ มาวิเคราะห์เนื้อสัมผัสอาหาร (Texture profile analysis) โดยให้แรงกดบนตัวอย่างอาหาร 2 ครั้ง เพื่อจำลองการใช้ฟันบดอาหารในรูปแบบเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงกับเวลา (TPA curve) พิจารณาค่าพารามิเตอร์ที่ใช้อธิบายเนื้อสัมผัสของอาหาร (TPA parameters) (ตารางที่ 4.2) ได้แก่ Hardness แสดงถึงแรงสูงสุดจากการเคี้ยวครั้งแรก Springiness แสดงถึงความสามารถในการคืนตัวหลังจากการเคี้ยวครั้งแรก Cohesiveness แสดงถึงพลังงานการยึดเกาะกันในเนื้ออาหาร Gumminess แสดงถึงพลังงานที่ทำให้อาหารแตกออกจนสามารถกลืนได้และ Chewiness แสดงถึงพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวอาหาร พบว่าเมื่ออัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศต่อปริมาตรของน้ำหมักเพิ่มขึ้น Hardness และ Cohesiveness มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่ Springiness, Gumminess และ Chewiness มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) จากงานวิจัยของ Akoğlu et al. (2015) อธิบายว่า Springiness มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความชื้นและความยืดหยุ่นของเนื้อสัมผัส BC ดังนั้นการเพิ่มอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศต่อปริมาตรของน้ำหมักเท่ากับเป็นการเพิ่มความชื้นในระบบ ส่งผลเพิ่มความยืดหยุ่นของ BC ที่ผลิตได้ทำให้มีค่า Springiness, Gumminess และ Chewiness เพิ่มขึ้น

นอกจากการประเมินการผลิต BC ในน้ำสับปะรดด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานนี้จะบ่งชี้ให้เห็นว่า น้ำสับปะรดตกเกรดพาสเจอร์ไรส์สามารถใช้เป็นน้ำหมักเพื่อผลิต BC ได้แล้ว สมการเชิงเส้นตรงของพื้นที่ผิวและปริมาตรน้ำหมักที่ได้ข้างต้น สามารถนำไปใช้ในการทำนายปริมาณผลิตภัณฑ์ BC ที่หมักได้ในน้ำสับปะรดด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานนี้ ทั้งในเชิงปริมาณในรูปแบบของ BC yield (%) และเชิงคุณภาพในรูปแบบเนื้อสัมผัสของ BC (Texture profile) ที่ต้องการตามวัตถุประสงค์การผลิตได้อีกด้วย



ภาพที่ 4.2 ผลของพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศและปริมาตรของน้ำหมักสับปะรดต่อการผลิต BC ด้วย *K. xylinus* TISTR 428



ตารางที่ 4.2 ผลของพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศและปริมาตรของน้ำหมักกับประสิทธิภาพ BC yield (%) และ Texture profile ของ BC ที่ผลิตด้วย *K. xylinus* TISTR 428 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์

รูปทรงภาษา อัตรากลวงระหว่าง พื้นที่ผิวสัมผัส อากาศต่อปริมาตร น้ำหมัก(cm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup> )	BC yield (%)	Hardness	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness	
							ทรงสี่เหลี่ยม (I)
0.43	27.03±0.11 <sup>e</sup>	62.13±3.17 <sup>f</sup>	0.57±0.14 <sup>a</sup>	0.92±0.07 <sup>a</sup>	56.63±1.25 <sup>b</sup>	32.55±8.56 <sup>c</sup>	
0.49	27.80±0.10 <sup>de</sup>	2,120.91±17.35 <sup>b</sup>	0.19±0.01 <sup>c</sup>	0.20±0.01 <sup>c</sup>	398.10±36.69 <sup>a</sup>	72.58±7.73 <sup>bc</sup>	
0.62	31.20±0.00 <sup>de</sup>	2,577.86±105.72 <sup>a</sup>	0.28±0.00 <sup>bc</sup>	0.22±0.03 <sup>c</sup>	556.30±52.55 <sup>a</sup>	154.85±15.64 <sup>ab</sup>	
0.64	39.22±3.86 <sup>d</sup>	1,864.15±77.02 <sup>c</sup>	0.24±0.00 <sup>bc</sup>	0.20±0.02 <sup>c</sup>	381.38±54.09 <sup>a</sup>	88.55±11.69 <sup>bc</sup>	
1.04	54.70±3.74 <sup>c</sup>	1,978.96±63.39 <sup>bc</sup>	0.33±0.03 <sup>bc</sup>	0.31±0.02 <sup>bc</sup>	598.63±7.28 <sup>a</sup>	192.39±12.96 <sup>a</sup>	
1.29	55.30±0.90 <sup>c</sup>	2,181.00±17.40 <sup>b</sup>	0.25±0.00 <sup>bc</sup>	0.18±0.02 <sup>c</sup>	384.57±27.52 <sup>a</sup>	95.56±8.08 <sup>abc</sup>	
1.68	71.65±2.27 <sup>b</sup>	985.95±14.41 <sup>e</sup>	0.37±0.02 <sup>b</sup>	0.39±0.04 <sup>bc</sup>	384.00±48.35 <sup>a</sup>	141.59±25.03 <sup>ab</sup>	
5.12	120.32±7.68 <sup>a</sup>	1,627.84±125.93 <sup>d</sup>	0.39±0.02 <sup>b</sup>	0.24±0.03 <sup>c</sup>	391.13±75.21 <sup>a</sup>	153.54±35.68 <sup>ab</sup>	

<sup>a-f</sup> Values with the different superscript letters in the same column show significant differences ( $p < 0.05$ )

## 4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Bacterial Cellulose (BC) ในน้ำสับปะรด

### 4.2.1 แหล่งคัดเลือกจุลินทรีย์และระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้าง BC

แบคทีเรียที่คัดแยกจากแหล่งธรรมชาติเดียวกับแหล่งเพาะเลี้ยง (Autochthonous) มีประสิทธิภาพในการเจริญและผลิตสารเมตาบอไลต์สูงกว่าสายพันธุ์ที่คัดแยกจากแหล่งอื่น (Allochthonous) (Chanprasartsuk & Prakitchaiwattana, 2022; Karahan et al., 2011) ดังนั้นเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต BC จากน้ำสับปะรดได้ดี งานวิจัยนี้จึงนำน้ำหมักสมุนไพรมีส่วนผสมของสับปะรด และมีขึ้นฉันทวนลอยตัวเหนือผิวน้ำหมัก อายุ 8 ปี 5 ปี และ 10 เดือน มาเป็นแหล่งคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อผลิต BC ในน้ำสับปะรด โดยออกแบบวิธีการคัดแยกเป็น 2 วิธี คือ คัดแยกจากน้ำหมักสมุนไพรรโดยตรง และการ Pre-enrichment ด้วยการเติมน้ำสับปะรด 4 วิธี ได้แก่ น้ำสับปะรดคั้นสดเติมน้ำสับปะรดคั้นสดเติมแอลกอฮอล์ 2 % (v/v) น้ำสับปะรดพาสเจอร์ไรซ์เติมน้ำสับปะรดคั้นสดเติมน้ำสับปะรดคั้นสดเติมแอลกอฮอล์ 2 % (v/v) คัดแยกจุลินทรีย์ ทุก 2 วัน โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ NA และ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 วัน GYEA (Glucose yeast extract agar) และ YMA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน และคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิต Bacterial cellulose-like บนผิวน้ำของน้ำสับปะรดพาสเจอร์ไรซ์

เมื่อคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพรรอายุ 8 ปี โดยตรงและ Pre-enrichment ด้วยการเติมน้ำสับปะรด 4 วิธี คัดแยกได้วิธีละ 1 ไอโซเลทจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NA รวมเป็น 5 ไอโซเลท โดยที่ไอโซเลทข้างต้นมีลักษณะทางสัณฐานวิทยารูปแบบเดียวกัน และเป็นไอโซเลทที่ไม่ผลิตสารคล้าย BC (Bacterial cellulose-like substance) ในขณะที่เมื่อคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพรรอายุ 5 ปี โดยตรงและ Pre-enrichment ด้วยการเติมน้ำสับปะรด 4 วิธี คัดแยกได้ไอโซเลทจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NA วิธีละ 1 ไอโซเลท รวมเป็น 5 ไอโซเลท โดยที่ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากน้ำหมักสมุนไพรรอายุ 5 ปี มีลักษณะทางสัณฐานวิทยารูปแบบเดียวกันกับไอโซเลทที่คัดแยกได้จากน้ำหมักสมุนไพรรอายุ 8 ปี จึงสันนิษฐานว่า เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน นอกจากนี้คัดแยกไอโซเลทเพิ่มเติมอีก 2 ไอโซเลทจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YMA จากวิธีการคัดแยกโดยตรง 1 ไอโซเลท และจากการคัดแยกหลัง Pre-enrichment ด้วยการเติมน้ำสับปะรดพาสเจอร์ไรซ์ผสมเอทานอลความเข้มข้น 2 % (v/v) 1 ไอโซเลท และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยารูปแบบเดียวกัน สังเกตได้ว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากน้ำหมักสมุนไพรรอายุ 8 และ 5 ปี ไม่พบจุลินทรีย์ที่ผลิต BC-like substance ระหว่างการ Pre-enrichment ในน้ำสับปะรด และคัดแยกจุลินทรีย์ได้น้อย มีความเป็นไปได้ว่าน้ำหมักสมุนไพรมีอายุมากเกินไป ส่งผลให้จุลินทรีย์ผลิต BC ตาย และจุลินทรีย์ที่พบน่าจะเป็นจุลินทรีย์ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหารที่มักพบในอาหารที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลานาน

เมื่อคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพรอายุ 10 เดือน โดยตรง พบ 1 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดรวม 4 ไอโซเลท และพบว่า การ Pre-enrichment ด้วยน้ำสับประรด 4 วิธีมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในน้ำหมักสมุนไพร ส่งผลให้มีโอกาสที่จะพบจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น และคัดแยกไอโซเลทได้มากขึ้น รวมทั้งสิ้น 35 ไอโซเลท เนื่องด้วยผลสับประรดพันธุ์ปัตตาเวีย 100 กรัม มีปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 87.24, 0.13, 0.55, 1.40 และ 11.82 กรัม ตามลำดับ จุลินทรีย์จึงสามารถน้ำสับประรดเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเพื่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ (อรอง จันทรประสาทสุข, 2558) นอกจากนี้เอทานอลยังสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้อีกด้วย (Sun et al., 2020)

เมื่อพิจารณาการ Pre-enrichment น้ำหมักสมุนไพรอายุ 10 เดือน ด้วยน้ำสับประรดคั้นสดและน้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์พบ 8 และ 7 ไอโซเลท ตามลำดับ และเมื่อเติมสารชักนำการผลิต BC คือ เอทานอล ความเข้มข้น 2 % (v/v) ในน้ำสับประรดคั้นสดและน้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์พบ 11 และ 9 ไอโซเลท ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า พบไอโซเลทในน้ำสับประรดแบบคั้นสดมากกว่าแบบพาสเจอร์ไรซ์ เนื่องจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดของ กรดอะมิโน วิตามินซี และน้ำตาล ระหว่างกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์น้ำสับประรด ส่งผลให้สูญเสียสารอาหารเหล่านี้ไป สารอาหารลดลง จึงพบจุลินทรีย์น้อยกว่าน้ำสับประรดแบบคั้นสด (Hounhouigan et al., 2014) โดยพบว่า การคัดแยกหลัง Pre-enrichment ด้วยน้ำสับประรดคั้นสด บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA, GYEA, MRS และ YMA 3, 2, 2 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ; Pre-enrichment ด้วยน้ำสับประรดคั้นสดเติมแอลกอฮอล์ 2 % (v/v) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA, GYEA, MRS และ YMA 3, 3, 3 และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ; Pre-enrichment ด้วยน้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์เต็มส่วน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA, GYEA, MRS และ YMA 3, 2, 1 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ; และ Pre-enrichment ด้วยน้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์เติมแอลกอฮอล์ 2 % (v/v) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA, GYEA, MRS และ YMA 3, 2, 1 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 35 ไอโซเลท จัดเป็นแบคทีเรีย 28 ไอโซเลท และยีสต์รา 7 ไอโซเลท

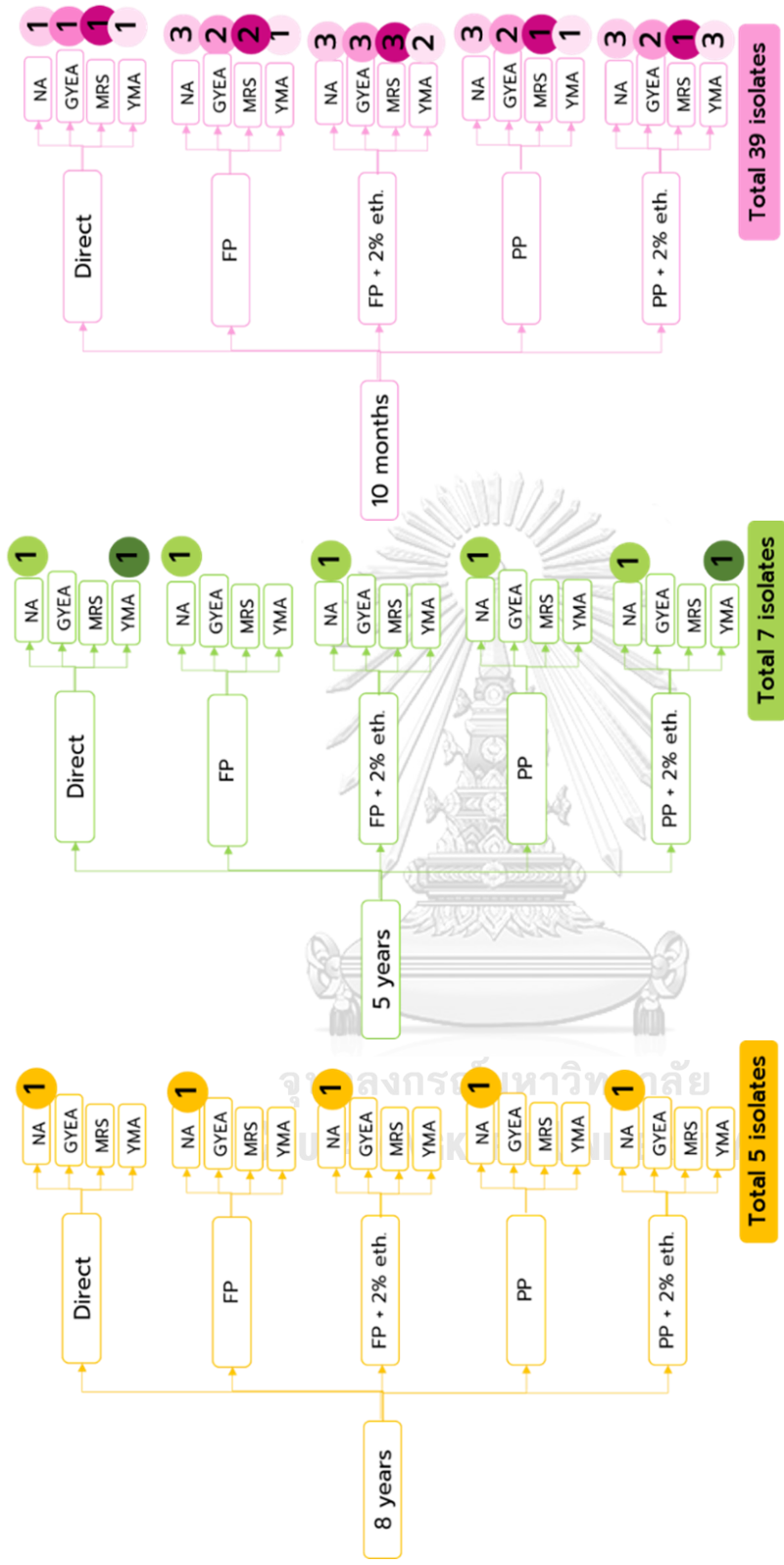
นอกจากนี้ในระหว่างการ Pre-enrichment น้ำหมักสมุนไพรอายุ 10 เดือน ในน้ำสับประรดพบ BC-like substance ลอยตัวอยู่ในน้ำหมัก คาดว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต BC ได้ในน้ำสับประรดที่สามารถเจริญและยังคงฟุ้งก่ขึ้นการผลิต BC จึงเลือกจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากน้ำหมักสมุนไพรอายุ 10 เดือนเหล่านี้ มาศึกษาต่อ โดยที่พบว่า จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลท จากน้ำหมักสมุนไพรอายุ 10 เดือน มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน 7 รูปแบบ ได้แก่ K1, K3, K4, K5, K6, K7 และ K8 จากนั้นทดสอบสมบัติการสร้าง BC ในน้ำสับประรดด้วยไอโซเลท (ตารางที่ 4.3)

ภายหลังการหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ไอโซเลท K1, K3, K4 และ K8 สามารถผลิตสารคล้าย BC ได้

เมื่อระบุชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 16s rDNA/RNA พบว่า ไอโซเลท K1, K3, K4 และ K8 คือ *Kodamaea ohmeri* (98.33 %) *G. xylinus* (80.16 %) *Acinetobacter sp.* (73.97 %) และ *Enterobacter cloacae* (82.31 %) ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4 โดยมีรายงานว่าแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์เหล่านี้สามารถผลิต BC ได้ (Adebayo-Tayo et al., 2017; Gayathry, 2015; Ji et al., 2016; Junqueira et al., 2012) อย่างไรก็ตามเนื่องจาก ไอโซเลท K3 มีสมบัติทางจีโนมที่ตรงกับสายพันธุ์ทางการค้าตามข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหาร (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2564) อีกทั้งมีรายงานการคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเซลลูโลสจากแหล่งผลไม้เน่า คอมบูชา น้ำส้มสายชูหมัก ของเสียจากการหมักน้ำส้มสายชู และของเสียจากอุตสาหกรรมผลไม้ (Du et al., 2018; Singh et al., 2017; Zhang et al., 2018) ตัวอย่างเช่น Singh et al. (2017) คัดแยก *G. xylinus* C18 ได้จากผลไม้เน่า มีรายงานว่า แบคทีเรียสามารถสร้างเซลลูโลสได้ 4.34 g/L ในของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร กากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 10.77 % (w/v) เติมน้ำหมักข้าวโพด 12.47 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 31 °C เป็นเวลา 172 ชั่วโมง นอกจากนี้ พบว่า ผล Whole genome sequence (WGS) ระบุว่า ไอโซเลท K3 มีความคล้ายคลึงกับ *K. xylinus* NBRC 13693 (88.07%) อีกด้วย (ไม่แสดงผล) ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้น่าจะสามารถผลิต BC ภายใต้สภาวะที่หลากหลายซึ่งเป็นคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นสายพันธุ์อุตสาหกรรมได้


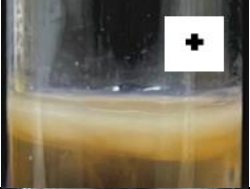



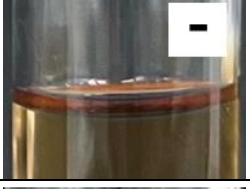
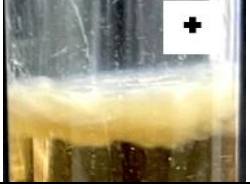
เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการสร้าง BC ในน้ำสับปรดด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จาก น้ำหมักสมุนไพรที่มีส่วนผสมของสับปรด (Autochthonous) K3 กับสายพันธุ์มาตรฐาน (Allochthonous) TISTR 428 หมักเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง และสังเกตความหนาของ BC ที่ผลิตได้ พบว่า ไอโซเลทผลิต BC ได้หนากว่าสายพันธุ์มาตรฐานได้มากกว่า 2 เท่า ดังภาพที่ 4.4 บ่งชี้ว่า จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติเดียวกับแหล่งเพาะเลี้ยงมีประสิทธิภาพในการผลิต BC ในน้ำสับปรดได้ดีกว่าสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากแหล่งอื่น แม้ว่าเพาะเลี้ยง TISTR428 ในน้ำสับปรดเป็นระยะเวลาสั้น สามารถพัฒนาสายพันธุ์มาตรฐานให้มีความคุ้นชินกับน้ำสับปรด และผลิต BC ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นได้ แต่อย่างไรก็ตามหากจุลินทรีย์ไม่มีสมบัติการเป็น Autochthonous strains จุลินทรีย์มีกลไก Self-regulation ทำให้กลับมามีสมบัติทางธรรมชาติเดิมของสายพันธุ์





ภาพที่ 4.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพร (8 ปี, 5 ปี และ 10 เดือน) โดยตรง และ pre-enrichment 4 ชนิด ได้แก่ น้ำสับประรดคั้นสด (FP); น้ำสับประรดคั้นสดเติมแอลกอฮอล์ 2 % (v/v) (FP+2% eth); น้ำสับประรดพาสเจอร์ไรส์เติมส่วน (PP); และน้ำสับประรดพาสเจอร์ไรส์เติมแอลกอฮอล์ 2 % (v/v) (PP+2% eth)

ตารางที่ 4.3 แสดงสมบัติการสร้าง BC ในน้ำสับประรดด้วยไอโซเลท ภายหลังจากการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

Isolate	BC production <sup>a</sup>
K1	
K3	
K4	
K5	
K6	
K7	
K8	

<sup>a</sup> BC production on pasteurized pineapple juice surface

ตารางที่ 4.4 ระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 16s rDNA/RNA

Isolate	Length (bp)	Closest relative (NCBI accession no.)	Identity (%) <sup>a</sup>
K1	496	<i>Kodamaea ohmeri</i> SM14UFAM (MN268772.1)	98.33
K3	420	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> NUST1292 (EU360440.2)	80.16
K4	443	<i>Acinetobacter</i> sp. NIOB 016 (EU816956.1)	73.97
K8	770	<i>Enterobacter cloacae</i> KLHD10 (KX450930.1)	82.31

<sup>a</sup> Identity represents the %identity shared with the sequences in the GenBank databases



ภาพที่ 4.4 การผลิต BC ในน้ำสับปะรดด้วยไอโซเลท K3 และแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *K. xylinus* TISTR 428 วันที่ 4 ของการหมักที่อุณหภูมิห้อง

#### 4.2.2 ศึกษาสภาวะการหมักน้ำสับประรดด้วยไอโซเลท

เมื่อพิจารณาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต BC นอกจากการคัดแยกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต BC ได้ปริมาณมากในเวลาอันสั้นในหัวข้อ 4.2.1 แล้ว ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้าง BC ของไอโซเลทที่คัดแยกได้ ในหัวข้อนี้จึงประเมินสภาวะการเพาะเลี้ยง โดยการแปรปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้อง คือ แหล่งอาหาร ได้แก่ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน โดยทั่วไปการผลิต BC ด้วย *G. xylinus* ในอุตสาหกรรมอาหารมักใช้น้ำมะพร้าวในการหมักมีรายงานว่า น้ำสับประรดมีปริมาณฟอสเฟตต่ำกว่าน้ำมะพร้าว (Junsangsree et al., 2002) ซึ่งฟอสเฟตจำเป็นต่อการผลิตโคเอนไซม์ที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Cellulose synthase เพื่อผลิต BC (Schirmer & Jenal, 2009) ดังนั้นการใช้น้ำสับประรดในการหมักจึงต้องปรับปริมาณแหล่งอาหารและสารชักนำให้เหมาะสม งานวิจัยนี้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลท K3 ในน้ำสับประรดพาสเจอร์ไรซ์ โดยแปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 % (w/v) แหล่งไนโตรเจน (เพปโตน) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.5 % (w/v) และแปรปริมาณสารชักนำ (โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.4 % (w/v) ทั้งหมด 12 สภาวะ ปรับน้ำหมักให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 4.0 ก่อนการหมักด้วยกรดอะซิติก บ่มเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 30 °C ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่และชีวภาพของ BC ที่ได้ และน้ำสับประรดหลังหมัก พบว่า ไอโซเลทสามารถสร้าง BC ได้ภายใต้ทั้ง 12 สภาวะ จากภาพที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่า ความหนาของ BC เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันแรกถึงวันที่ 10 และคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก และพบว่า สมบัติทางเคมีของน้ำสับประรดหลังหมักมี TA เพิ่มขึ้น เป็นผลมาจากแบคทีเรียไฮโดรไลซ์ซูโครสเป็นฟรักโทส และกลูโคส เพื่อผลิต BC โดยปริมาณฟรักโทสที่เพิ่มขึ้นส่งเสริมการสร้างผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ คือ กรดกลูโคนิก ส่งผลให้น้ำหมักมีค่า TSS และ pH ที่ลดลงภายหลังการหมัก (Nakai et al., 1999)

จากภาพที่ 4.6 แสดงสมบัติทางเคมีของน้ำสับประรดหลังหมักทั้ง 12 สภาวะ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยพบว่า ที่ปริมาณแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) คงที่ การแปรปริมาณแหล่งไนโตรเจน (เพปโตน) และ สารชักนำ (โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ TA ที่เพิ่มขึ้น (TA promotion, %) pH ที่ลดลง (pH reduction, %) และ TSS ที่ลดลง (TSS reduction, %) มีแนวโน้มในรูปแบบเดียวกัน และสอดคล้องกับปริมาณของ BC ที่ผลิตได้ (ตารางที่ 4.6) นั่นคือ การเติมสารชักนำ 0.4 % (w/v) ในสภาวะที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนส่งผลให้ TA สูงกว่า pH และ TSS น้อยกว่าการไม่เติมสารชักนำอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่การเติมสารชักนำ 0.4 % (w/v) ในสภาวะที่เติมแหล่งไนโตรเจน 0.5 % (w/v) ส่งผลในทางกลับกัน โดยพบว่า

TA น้อยกว่า pH และ TSS มากกว่าการไม่เติมสารชักนำอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เนื่องจากเซลล์ *G. xylinus* เกิด plasmolysis และจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดผลิต BC ได้ลดลง (Faridah et al., 2013)

เมื่อพิจารณาปริมาณแหล่งไนโตรเจน พบว่า ที่ปริมาณแหล่งคาร์บอนเท่ากัน การเติมแหล่งไนโตรเจนส่งผลให้ค่า TA สูงกว่า มีค่า pH และ TSS น้อยกว่าการไม่เติมแหล่งไนโตรเจนอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) บ่งชี้ว่า การเติมแหล่งไนโตรเจนส่งเสริมให้ BC ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนจำเป็นต่อการซ่อมแซมเซลล์ ส่งเสริมการเจริญของเซลล์จึงมีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดผลิต BC เพิ่มขึ้น ได้ปริมาณ BC เพิ่มขึ้น (Adnan et al., 2015; Çoban & Biyik, 2011; El-Salam, 2012; Lin et al., 2013; Mohammadkazemi et al., 2015) โดยพบว่า สภาวะที่มีปริมาณ BC ภายหลังการหมักสูงสุด คือ สภาวะ 121 ( $188.27 \pm 0.50$  g/L) มีปริมาณซูโครส เพปโทน และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 5, 0.5 และ 0 % (w/v) ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นได้ว่าการเติมแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อปริมาณ BC ที่ผลิตได้และสมบัติทางเคมีของน้ำสับปะรดหลังหมักอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) สามารถนำความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต BC ด้วยไอโซเลท K3 สูงที่สุดในน้ำสับปะรดนี้ ไปปรับใช้ผลิต BC ให้มีคุณสมบัติตามต้องการในเชิงปริมาณได้ โดยไม่จำเป็นต้องเติมสารชักนำ (โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) หากมีแหล่งไนโตรเจนที่เพียงพอ

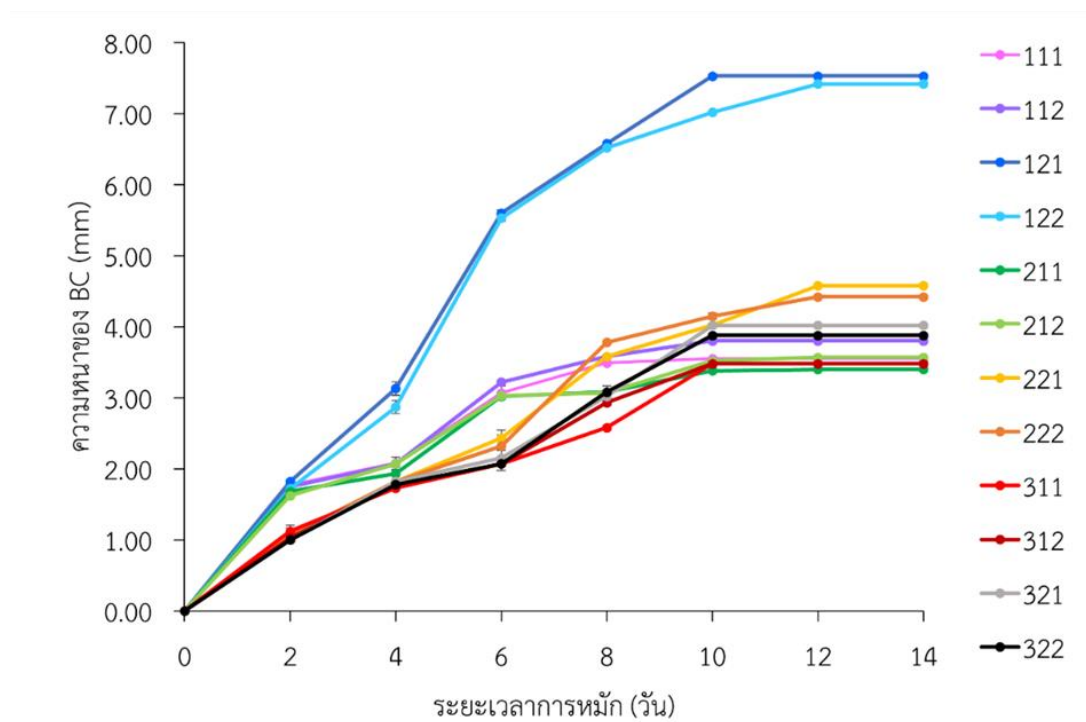
ภาพที่ 4.7 แสดงผลปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (Total phenolic compound, TPC) ใช้สารประกอบ Folin-Ciocalteu สีเหลืองเข้ารีบิเล็กตรอนจากสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเชิงปริมาณด้วยวิธีเคมีโดยใช้ออนุมูลอิสระ (diphenyl-picrylhydrazyl radical, DPPH•) มีสีม่วงเข้าจับกับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างจะมีสีที่จางลงเป็นสีเหลือง จากการเปลี่ยนแปลงของสีตามปริมาณสารข้างต้นส่งผลให้สามารถวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในเชิงปริมาณได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่า ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำสับปะรดภายหลังการหมักทั้ง 12 สภาวะ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับน้ำสับปะรดก่อนหมัก อีกทั้งแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของน้ำสับปะรดภายหลังการหมักทั้ง 12 สภาวะ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) และเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของน้ำสับปะรดภายหลังการหมัก (ภาพที่ 4.6) บ่งชี้ว่า ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกับการเจริญของ

แบคทีเรียในน้ำหมัก เนื่องจากเอนไซม์จากแบคทีเรียเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและ/หรือลดรูปของพอลิฟีนอลเชิงซ้อนเป็นสารประกอบฟีนอล ส่งผลให้น้ำสับปะรดหลังหมักมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเพิ่มขึ้นจากก่อนหมัก (Zubaidah et al., 2018) สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Zhang et al. (2021) รายงานว่า การหมัก Chinese wolfberry juice ด้วย *K. xylinus* เพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และเสริมฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยที่น้ำสับปะรดภายหลังการหมักสภาวะ 121 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุด และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) จะเห็นได้ว่าการเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสารชักนำมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ของน้ำสับปะรดหลังหมักอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

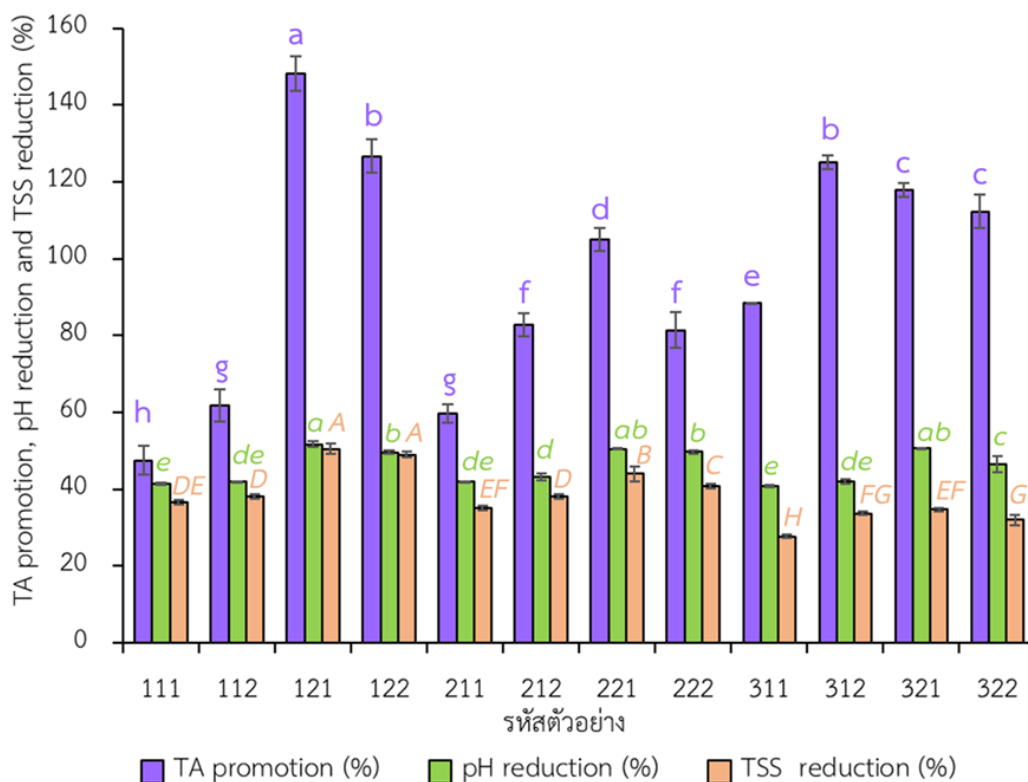
เมื่อทดสอบเนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง Texture analyzer พบว่า BC ที่สภาวะที่หมักปริมาณ BC สูงที่สุด (สภาวะ 121) มีค่า Hardness และ Gumminess ต่ำอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ตรงกันข้ามกับค่า Springiness และ Cohesiveness มีค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม ทั้ง 12 สภาวะมีค่า Chewiness ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 สอดคล้องกับปริมาณความชื้นในตารางที่ 4.6 พบว่า ที่สภาวะดังกล่าวมีปริมาณความชื้นสูงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เนื่องจากมีรายงานว่าค่า springiness แปรผันโดยตรงกับปริมาณความชื้น และความยืดหยุ่นของ BC (Akoğlu et al., 2015) นอกจากนี้พบว่า ค่า Water activity (Aw) และความชื้น (%) แปรผันตามปริมาณ BC เนื่องจาก BC สร้างออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปของนาโนไฟบริลที่รวมตัวเป็นไมโครไฟบริลกลายเป็นเส้นใยริบบอนที่สามารถปิดล้อมกักเก็บน้ำได้มากถึง 99% (Cielecka et al., 2019) จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า การปรับปรุงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต BC นั้นคือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสารชักนำ ให้มีสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียผลิต BC ส่งผลต่อเนื้อสัมผัสของ BC อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) สอดคล้องกับหัวข้อ 4.1.2 พบว่า เมื่อปรับปริมาณออกซิเจนซึ่งเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต BC โดยแปรอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศและปริมาตรน้ำหมักส่งผลต่อเนื้อสัมผัสของ BC อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกัน

เมื่อพิจารณาสีของ BC ภายหลังการหมักดังแสดงในภาพที่ 4.8 และตารางที่ 4.7 พบว่าการเติมเพพไทด์ และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตส่งผลให้ BC มีสีที่แตกต่างกัน เป็นผลมาจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดระหว่างคาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโน โดยซูโครสและเพพไทด์ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำก่อนนำไปใช้ในการทดลองนี้ อีกทั้งฟอสเฟตมีส่วนเกี่ยวข้องด้วยการเร่งอัตราการเกิดสีน้ำตาลของปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Rizzi, 2004)

จากประสิทธิภาพในการหมักและสมบัติทางเคมีกายภาพของ BC และน้ำหมักข้างต้น จึงเลือกสภาวะที่ 121 มาศึกษาการผลิต BC ด้วย *G. xylinus* (K3) ร่วมกับจุลินทรีย์ *L. plantarum* FTCU10621 ต่อไป

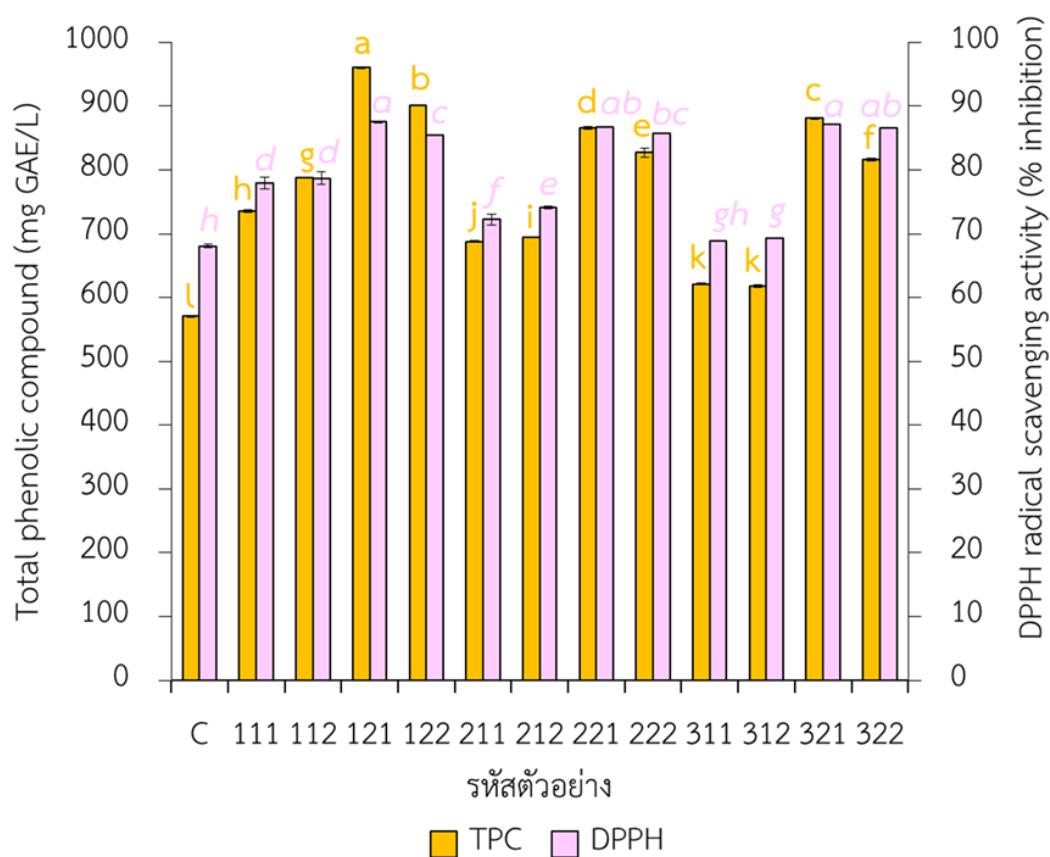


ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงความหนาของ BC (mm) ที่ผลิตด้วยไอโซเลท K3 ในน้ำสับปะรดแปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 % (w/v) แหล่งไนโตรเจน (เพปโตน) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.5 % (w/v) และแปรปริมาณสารชักนำ (โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.4 % (w/v) ทั้งหมด 12 สภาวะ หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

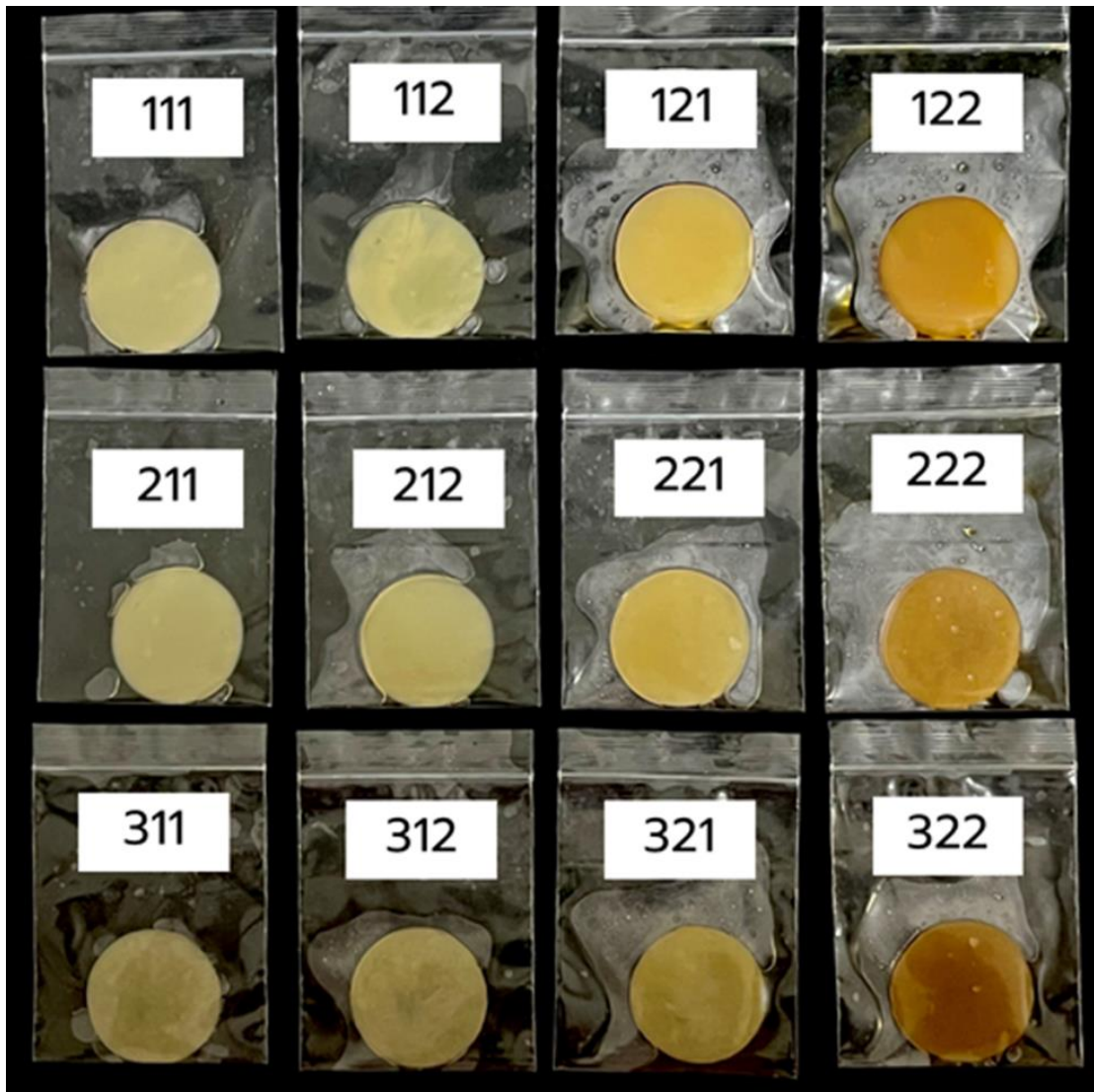


ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงของน้ำส้มปะรด แปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 % (w/v) แหล่งไนโตรเจน (เพปโตน) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.5 % (w/v) และแปรปริมาณสารชักนำ (โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.4 % (w/v) ทั้งหมด 12 สภาวะ ภายหลังจากหมักด้วยไอโซเลท K3 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน โดยที่<sup>a-h</sup>เปรียบเทียบร้อยละของ TA ที่เพิ่มขึ้น (TA promotion, %) <sup>a-c</sup>เปรียบเทียบร้อยละของ pH ที่ลดลง (pH reduction, %) และ<sup>A-H</sup>เปรียบเทียบร้อยละของ TSS ที่ลดลง (TSS reduction, %) ของน้ำส้มปะรด ภายหลังจากหมัก ( $p < 0.05$ )





ภาพที่ 4.7 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (Total phenolic compound, TPC) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (DPPH radical scavenging activity) ของน้ำสับปรดก่อนหมัก (C) และน้ำสับปรดภายหลังการหมักด้วยไอโซเลท K3 แปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 % (w/v) แหล่งไนโตรเจน (เพปโตน) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.5 % (w/v) และแปรปริมาณสารชักนำ (โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.4 % (w/v) ทั้งหมด 12 สภาวะ หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน โดยที่ <sup>a-l</sup>เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (Total phenolic compound, TPC) <sup>a-h</sup>เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (DPPH radical scavenging activity) ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 4.8 สีของ BC ภายหลังจากหมักด้วยไอโซเลท K3 แปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 % (w/v) แหล่งไนโตรเจน (เพปโตน) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.5 % (w/v) และแปรปริมาณสารชักนำ (โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.4 % (w/v) ทั้งหมด 12 สภาวะ หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

ตารางที่ 4.5 เนื้อสัมผัสของ BC ภายหลังจากการหมักด้วยไฮไลต์ K3 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

รหัสตัวอย่าง	Hardness	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness
111	3,779.711±290.47 <sup>bc</sup>	0.603±0.01 <sup>ef</sup>	0.384±0.02 <sup>ab</sup>	1,445.455±29.87 <sup>ab</sup>	871.326±1.71 <sup>a</sup>
112	2,058.705±430.77 <sup>c</sup>	0.648±0.01 <sup>def</sup>	0.385±0.02 <sup>ab</sup>	799.101±202.23 <sup>b</sup>	519.174±135.87 <sup>a</sup>
121	1,997.849±169.42 <sup>c</sup>	0.916±0.02 <sup>a</sup>	0.437±0.02 <sup>a</sup>	869.959±44.09 <sup>b</sup>	797.380±53.16 <sup>a</sup>
122	1,821.079±339.25 <sup>c</sup>	0.854±0.04 <sup>ab</sup>	0.421±0.00 <sup>a</sup>	765.924±136.90 <sup>b</sup>	659.824±150.41 <sup>a</sup>
211	1,540.830±265.60 <sup>c</sup>	0.542±0.04 <sup>f</sup>	0.348±0.06 <sup>abc</sup>	520.793±2.58 <sup>b</sup>	281.909±21.27 <sup>a</sup>
212	1,490.197±433.41 <sup>c</sup>	0.636±0.03 <sup>def</sup>	0.370±0.05 <sup>ab</sup>	573.545±237.54 <sup>b</sup>	371.447±167.17 <sup>a</sup>
221	2,030.010±178.38 <sup>c</sup>	0.823±0.02 <sup>abc</sup>	0.378±0.01 <sup>ab</sup>	768.320±97.05 <sup>b</sup>	630.453±64.85 <sup>a</sup>
222	3,266.082±395.56 <sup>bc</sup>	0.795±0.04 <sup>bc</sup>	0.407±0.05 <sup>ab</sup>	1,347.768±317.21 <sup>ab</sup>	1,082.519±303.8 <sup>a</sup>
311	6,571.080±976.87 <sup>a</sup>	0.324±0.03 <sup>g</sup>	0.303±0.06 <sup>bc</sup>	2,046.701±658.24 <sup>a</sup>	684.902±280.34 <sup>a</sup>
312	5,045.016±85.43 <sup>ab</sup>	0.336±0.06 <sup>g</sup>	0.256±0.01 <sup>c</sup>	1,293.330±57.29 <sup>ab</sup>	437.426±90.57 <sup>a</sup>
321	2,990.197±1,862.27 <sup>bc</sup>	0.733±0.06 <sup>cd</sup>	0.430±0.02 <sup>a</sup>	1,245.227±736.88 <sup>ab</sup>	955.641±613.73 <sup>a</sup>
322	3,450.802±387.43 <sup>bc</sup>	0.668±0.00 <sup>de</sup>	0.381±0.02 <sup>ab</sup>	1,305.265±63.17 <sup>ab</sup>	872.487±46.28 <sup>a</sup>

<sup>a-g</sup> Values with the different superscript letters in the same column show significant differences ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 4.6 น้ำหนักเปียก (g/L) water activity ( $A_w$ ) และความชื้น (%) ของ BC ภายหลังจากการหมักด้วยไอโซเลท K3 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

รหัสตัวอย่าง	น้ำหนักเปียก (g/L)	$A_w$	ความชื้น (%)
111	77.33±0.19 <sup>d</sup>	0.9795±0.001 <sup>b</sup>	74.81±0.01 <sup>ef</sup>
112	77.27±0.25 <sup>d</sup>	0.9761±0.001 <sup>c</sup>	75.78±0.16 <sup>c</sup>
121	188.27±0.50 <sup>a</sup>	0.9854±0.003 <sup>a</sup>	79.38±0.16 <sup>a</sup>
122	187.60±0.33 <sup>a</sup>	0.9854±0.001 <sup>a</sup>	78.41±0.19 <sup>b</sup>
211	77.40±0.20 <sup>d</sup>	0.9761±0.000 <sup>d</sup>	74.73±0.01 <sup>fg</sup>
212	84.40±0.40 <sup>c</sup>	0.9734±0.002 <sup>f</sup>	74.94±0.05 <sup>e</sup>
221	93.90±0.90 <sup>b</sup>	0.9745±0.001 <sup>e</sup>	75.57±0.02 <sup>d</sup>
222	93.50±0.10 <sup>b</sup>	0.9752±0.001 <sup>e</sup>	75.67±0.05 <sup>cd</sup>
311	65.60±0.40 <sup>f</sup>	0.9724±0.000 <sup>g</sup>	74.65±0.01 <sup>fg</sup>
312	58.60±1.00 <sup>g</sup>	0.9699±0.000 <sup>h</sup>	74.56±0.02 <sup>g</sup>
321	71.70±0.30 <sup>e</sup>	0.9720±0.000 <sup>g</sup>	75.49±0.03 <sup>d</sup>
322	72.10±0.50 <sup>e</sup>	0.9686±0.001 <sup>i</sup>	72.88±0.01 <sup>h</sup>

<sup>a-i</sup> Values with the different superscript letters in the same column show significant differences ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 4.7 ค่าสีของ BC ภายหลังจากหมักด้วยไอโซเลท K3 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

รหัสตัวอย่าง	L*	a*	b*
111	67.65±3.93 <sup>ab</sup>	0.68±0.02 <sup>de</sup>	17.71±2.46 <sup>bcd</sup>
112	63.21±0.91 <sup>abc</sup>	0.53±0.17 <sup>e</sup>	17.03±1.08 <sup>cd</sup>
121	54.34±0.38 <sup>cd</sup>	1.01±0.07 <sup>cde</sup>	9.43±0.05 <sup>e</sup>
122	50.71±3.83 <sup>d</sup>	2.39±1.14 <sup>bcd</sup>	11.63±1.58 <sup>e</sup>
211	72.37±6.66 <sup>a</sup>	0.45±0.10 <sup>e</sup>	17.04±0.30 <sup>cd</sup>
212	69.72±5.41 <sup>ab</sup>	0.55±0.00 <sup>e</sup>	18.48±0.52 <sup>bcd</sup>
221	59.32±1.64 <sup>bcd</sup>	3.09±0.04 <sup>b</sup>	18.99±0.43 <sup>bcd</sup>
222	50.29±2.04 <sup>d</sup>	8.16±0.70 <sup>a</sup>	21.09±1.31 <sup>b</sup>
311	70.22±2.77 <sup>a</sup>	0.33±0.23 <sup>e</sup>	15.55±0.09 <sup>d</sup>
312	68.92±0.08 <sup>ab</sup>	0.75±0.20 <sup>de</sup>	18.79±0.50 <sup>bcd</sup>
321	62.64±1.19 <sup>abc</sup>	2.56±0.38 <sup>bc</sup>	20.00±0.37 <sup>bc</sup>
322	53.03±3.04 <sup>cd</sup>	9.19±1.24 <sup>a</sup>	24.70±1.48 <sup>a</sup>

<sup>a-e</sup> Values with the different superscript letters in the same column show significant differences ( $p < 0.05$ )

#### 4.3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกร่วมกับการสร้าง BC ด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์ออโตคีนัสในน้ำ สับปะรดตกเกรด

ในปัจจุบันการพัฒนาการผลิตเมทาบอลไลท์ด้วยการหมักจุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมัก การเปลี่ยนแปลงของสารระหว่าง กระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์หมักร่วมอาจเป็นสารตั้งต้นของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ผลิต ผลิตภัณฑ์เป้าหมายส่งผลให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น หรือได้ผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ที่ส่งเสริมคุณค่าและ ประโยชน์ของผลิตภัณฑ์ (Prabhu et al., 2022) งานวิจัยนี้จึงประเมินการพัฒนาการผลิตน้ำหมัก สับปะรดเพื่อผลิต BC ที่อุดมด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติก สำหรับใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพแบบหลายฟังก์ชัน (Multifunctional drink) จึงทดลองหมักไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 ซึ่งเป็น Probiotic candidate สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จาก น้ำสับปะรด (Autochthonous) ในสถานะที่เลือกจากข้อ 4.2.2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า BC ที่ได้มีปริมาณน้อยลง ( $26.40 \pm 0.80$  g/L) และเป็น Young BC เนื่องจาก *L. plantarum* FTCU10621 ที่เจริญร่วมกับไอโซเลทแย่งใช้สารอาหารผลิตเป็นกรดอินทรีย์ มีรายงานว่า เมื่อระบบมี ความเป็นกรดสูง (pH ต่ำกว่า 4.0) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียผลิต BC ได้ ส่งผลให้ผลิต BC ได้น้อยลง (Zahan et al., 2015) เมื่อนำแผ่น BC มาตรวจหาจุลินทรีย์ที่มีชีวิตพบ K3 และ *L. plantarum* FTCU10621 มีจำนวน  $6.59 \pm 0.19$  และ  $8.42 \pm 0.52$  log CFU/g BC ตามลำดับ เมื่อตรวจในน้ำสับปะรดพบ K3 และ *L. plantarum* FTCU10621 ที่มีชีวิตจำนวน  $6.12 \pm 0.18$  และ  $8.33 \pm 0.03$  log CFU/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และ 4.9 นอกจากนี้ค่าสีของ BC ภายหลังกการหมัก (ตารางที่ 4.9) ภายได้สถานะที่หมักร่วมกับโพรไบโอติกมีค่า  $L^*$  สูงกว่าการหมักด้วย ไอโซเลทเพียงสายพันธุ์เดียว เป็นผลมาจากปริมาณ BC ที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ส่งผลให้มีความทึบแสงน้อยกว่า ค่า  $L^*$  จึงสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบน้ำสับปะรดก่อนหมักด้วยวิธี HPLC (ตารางที่ 4.10) พบว่า ประกอบด้วยกรดอินทรีย์หลักมากที่สุด คือ กรดซิตริก (7.61 g/L) และกรดมาลิก (1.75 g/L) ตามลำดับ น้ำตาลประกอบด้วยซูโครสมากที่สุด ( $15.87 \pm 1.69$  g/100 ml) รองลงมา คือ ฟรักโทส ( $5.78 \pm 0.24$  g/100 ml) และกลูโคส  $2.13 \pm 0.14$  g/100 ml) ตามลำดับ หลังหมักด้วยไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดียว พบกรดแอซิดิกในน้ำสับปะรดที่ผลิตจากไอโซเลท K3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิต กรดแอซิดิกได้จากแหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย (Mohammad et al., 2014) โดยในน้ำหมักหลังหมัก ด้วยไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดียวประกอบด้วยกรดอินทรีย์หลักมากที่สุด คือ กรดซิตริก (9.01 g/L)

กรดมาลิก (2.17 g/L) และกรดแอสติค (0.04 g/L) ตามลำดับ น้ำตาลประกอบด้วยฟรักโทสมากที่สุด (5.34±17.42 g/100 ml) รองลงมา คือ ซูโครส (4.37±12.79 g/100 ml) และกลูโคส (2.08±6.73 g/100 ml) ตามลำดับ

ในทางตรงข้ามหลังหมักไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 ไม่พบกรดแอสติค แต่พบกรดแลคติก โดยในน้ำหมักหลังหมักประกอบด้วยกรดอินทรีย์หลักมากที่สุด คือ กรดแลคติก (28.34 g/L) กรดซิตริก (8.00 g/L) กรดซัคซินิค (1.47 g/L) และกรดมาลิก (0.41 g/L) ตามลำดับ น้ำตาลประกอบด้วยฟรักโทสมากที่สุด (4.63±14.24 g/100 ml) รองลงมา คือ กลูโคส (4.37±12.79 g/100 ml) และซูโครส (1.23±3.59 g/100 ml) ตามลำดับ มีรายงานว่า นอกจากกรดแลคติกแล้ว *L. plantarum* ยังสามารถสร้างกรดซัคซินิคได้ (Nagashima et al., 2016) และจากกระบวนการสังเคราะห์ BC ของ *G. xylinus* (Matsushita et al., 2016) จึงมีความเป็นไปได้ว่า ไอโซเลท K3 ใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิต BC มากกว่าการสร้างกรดแอสติค จึงส่งผลให้ตรวจไม่พบกรดดังกล่าวในการหมักร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 นอกจากนี้พบว่า น้ำสับประรดภายหลังการหมักโพรไบโอติกร่วมกับไอโซเลท K3 ปริมาณซูโครสน้อยกว่าแต่มีปริมาณกลูโคส และฟรักโทสสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับหมักด้วยไอโซเลท K3 เดี่ยว ดังตารางที่ 4.9 เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียผลิต BC สร้างเอนไซม์ Levansucrase และ *L. plantarum* สร้างเอนไซม์ Glucansucrase และ Fructansucrase เพื่อย่อยซูโครส และเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของกลูโคส และฟรักโทสได้ (Davoodi et al., 2016; Di Cagno et al., 2006; Jaramillo L et al., 2012; Kornmann et al., 2003)

จากตารางที่ 4.10 เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในน้ำสับประรดก่อนการหมัก น้ำสับประรดหลังหมักด้วยไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดียว และน้ำสับประรดหลังหมักไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 พบว่า มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 68.08±0.24, 87.53±0.10 และ 84.40±0.05 % ตามลำดับ และพบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม เท่ากับ 570.90±1.41, 960.23±1.25 และ 640.23±2.36 mg GAE/L ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าภายหลังการหมักฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในน้ำสับประรดเพิ่มขึ้นจากก่อนหมักอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเป็นผลมาจากกระบวนการ Biotransformation ระหว่างการหมัก เกิดการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและ/หรือลดรูปของพอลิฟีนอลเชิงซ้อนเป็นสารประกอบฟีนอลด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรีย ส่งผลให้น้ำสับประรดหลังหมักมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเพิ่มขึ้นจากก่อนหมัก (Zubaidah et al., 2018) อย่างไรก็ตามปริมาณสารประกอบฟีนอลลีกกรมภายหลังการหมัก

ร่วมกับโพรไบโอติกมีค่าน้อยกว่าการหมัก K3 เดียวอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจาก *L. plantarum* สามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอลิกให้กลายเป็นสารระเหยได้ให้กลิ่นรสด้วยเอนไซม์ Phenolic acid decarboxylases (Rodríguez et al., 2009)

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบในแง่ขององค์ประกอบน้ำหมักระหว่างการหมักด้วยไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดียว และการหมักไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 พบว่า การหมักแบบไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 มีน้ำตาลเหลือน้อยกว่า ปริมาณกรดสูงกว่า ค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) จะเห็นได้ว่าการหมักไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 ในน้ำสับประรดสภาวะ 121 มีประโยชน์และดีต่อสุขภาพมากกว่า

เมื่อพิจารณาภาพถ่ายทางสัณฐานวิทยาของผิวหน้า BC ที่ผลิตด้วยไอโซเลท K3 และ K3 ร่วมกับโพรไบโอติกที่กำลังขยาย 5,000 เท่า พบว่า ผิวหน้าของ BC ที่ผลิตด้วยไอโซเลท K3 มีลักษณะขรุขระ ดังภาพที่ 4.9a ขณะที่ BC ที่ผลิตด้วยการหมัก K3 ร่วมกับโพรไบโอติกมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวและเรียบเนียน ดังภาพที่ 4.9b เนื่องจากน้ำหนักเปียกของ BC ที่ผลิตด้วยไอโซเลทสูงกว่า BC ที่ไอโซเลทผลิตจากการหมักร่วมกับโพรไบโอติกถึง 7 เท่า นั่นคือ มีปริมาณ BC มากกว่าและเป็นชั้นที่หนากว่า เส้นใย BC มีลักษณะเป็นโครงร่างตาข่ายที่ซับซ้อน จึงมีพื้นผิวลักษณะขรุขระกว่า เมื่อเทียบกับ BC ที่ไอโซเลทผลิตจากการหมักร่วมกับโพรไบโอติกที่เป็น Young BC นอกจากนี้ภาพที่ 4.9b ในพื้นที่  $491.52 \mu\text{m}^2$  พบเซลล์โพรไบโอติกฝังตัวอยู่ใน BC จำนวน 5 เซลล์ คิดเป็น  $7.08 \log \text{cell/g}$

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของ BC ที่ผลิตได้จากการหมักทั้ง 2 รูปแบบ ได้แก่ การหมักไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดียว และการหมักไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 ด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) อ้างอิงจากลักษณะการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นอินฟราเรดช่วง  $500\text{-}4,000 \text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นช่วงการดูดกลืนแสงของสารที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง BC (Halib et al., 2012; Johari et al., 2012) พบว่า IR สเปกตรัมของ BC ที่ผลิตได้จากการหมักทั้ง 2 รูปแบบเป็นไปในทางเดียวกัน และมีลักษณะใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 4.10 ปรากฏหมู่ฟังก์ชันของสารกลุ่มแอลเคน (Alkane) ที่  $2,931.88$  และ  $2,928.45 \text{ cm}^{-1}$  ตามลำดับ และปรากฏหมู่ฟังก์ชันของสารกลุ่มคาร์บอนิล (Carbonyl) ที่  $1,729.58$  และ  $1,722.90 \text{ cm}^{-1}$  ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่า IR สเปกตรัมของหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl) ในช่วงความยาวคลื่น  $3,500\text{-}3,200 \text{ cm}^{-1}$  ของ BC จากการหมักไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621



มี % transmittance ต่ำกว่า BC ที่หมักด้วยไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดียว เนื่องจากเกิดเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างสารกลุ่มไฮดรอกซิลในโครงสร้างกับกรดอินทรีย์ในน้ำหมัก โดยที่สารกลุ่มไฮดรอกซิลถูกแทนที่ด้วยกรดอินทรีย์ ส่งผลให้โครงสร้างเส้นใย BC ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นหมู่ไฮดรอกซิลมีความแข็งแรงลดลง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า BC จากการหมักไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 มีความอ่อนนุ่ม BC ที่หมักด้วยไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดียว (Musino et al., 2021)

จากผลวิจัยข้างต้นพบว่า ไอโซเลท *G. xylinus* (K3) สามารถหมักร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 ซึ่งเป็น Probiotic candidate ในน้ำสับปะรดและผลิต BC ได้ เป็นแนวทางการใช้สับปะรดตกเกรดผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่อุดมด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติกเพื่อเป็นเครื่องดื่มฟังก์ชันที่มีคุณสมบัติส่งเสริมสุขภาพ เนื่องจากประกอบด้วยใยอาหารจาก BC และน้ำหมักที่อุดมไปด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติก ทั้งนี้หากต้องการผลิตเพื่อให้ได้ BC ปริมาณมากขึ้นควรผลิตแบบ Sequential โดยเริ่มหมักแบคทีเรียเพื่อผลิต BC ก่อนจากนั้นจึงหมักร่วมกับโพรไบโอติก

ตารางที่ 4.8 จำนวนประชากรจุลินทรีย์ใน BC และน้ำหมักสับปะรดภายหลังการหมักไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดียว และการหมักไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 ภายใต้สภาวะ 121

ตัวอย่าง	จำนวนประชากรจุลินทรีย์			
	ไอโซเลท K3		<i>L. plantarum</i> FTCU10621	
	ก่อนหมัก	หลังหมัก	ก่อนหมัก	หลังหมัก
BC (log CFU/g)		6.59±0.19		8.42±0.52
น้ำหมัก (log CFU/ml)	6.08±0.04	6.12±0.18	6.87±0.49	8.33±0.03

ตารางที่ 4.9 สมบัติทางกายภาพของ BC ภายหลังจากหมักไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดี่ยว (121) และการหมักไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 (121+probiotic) ภายใต้อุณหภูมิ 121

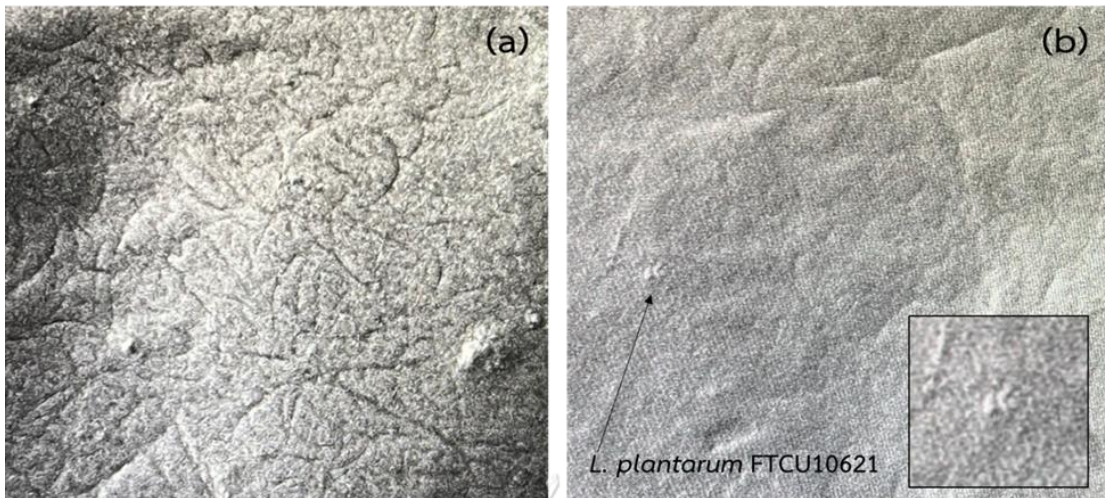
ตัวอย่าง	น้ำหนักเปียก (g/L)	ค่าสี		
		L*	a*	b*
121	188.27±0.50 <sup>a</sup>	54.34±0.38 <sup>ab</sup>	1.01±0.07 <sup>a</sup>	9.43±0.05 <sup>a</sup>
121 + probiotic	26.40±0.80 <sup>b</sup>	62.39±0.79 <sup>a</sup>	1.03±0.23 <sup>a</sup>	11.02±0.34 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup> Values with the different superscript letters in the same column show significant differences ( $p < 0.05$ )

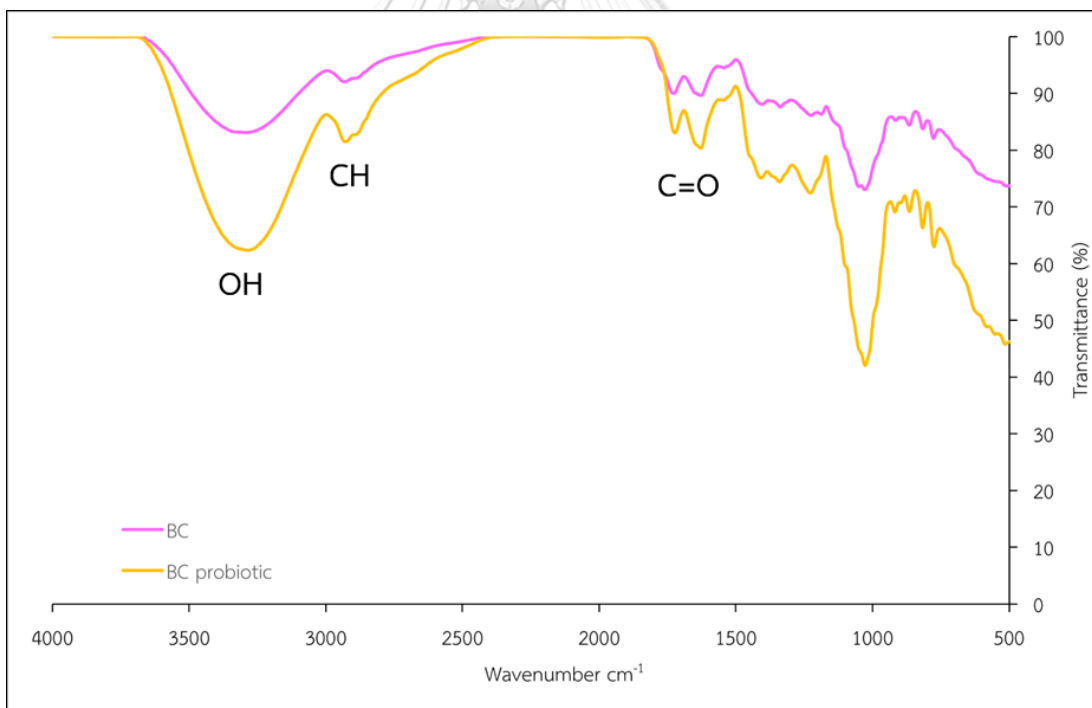
ตารางที่ 4.10 สมบัติทางกายภาพของน้ำสับปรดก่อนการหมัก น้ำสับปรดภายหลังจากหมักด้วยไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดี่ยว (121) และน้ำสับปรดภายหลังจากหมักด้วยไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 (121+probiotic) ภายใต้อุณหภูมิ 121

สมบัติ	Pre-fermented pineapple juice	121	121 + Probiotic	
Antioxidant activity	TPC (mg GAE/L)	570.90±1.41 <sup>c</sup>	960.23±1.25 <sup>a</sup>	640.23±2.36 <sup>b</sup>
	DPPH (% inhibition)	68.08±0.24 <sup>c</sup>	87.53±0.10 <sup>a</sup>	84.40±0.05 <sup>b</sup>
Sugar content (g/100 ml)	Fructose	5.78±0.24 <sup>a</sup>	5.34±17.42 <sup>a</sup>	4.63±14.24 <sup>a</sup>
	Glucose	2.13±0.14 <sup>a</sup>	2.08±6.73 <sup>a</sup>	4.37±12.79 <sup>a</sup>
	Sucrose	15.87±1.69 <sup>a</sup>	4.37±12.79 <sup>b</sup>	1.23±3.59 <sup>b</sup>
Organic acids (g/L)	Malic acid	1.75	2.17	0.41
	Lactic acid	0.00	0.00	28.34
	Acetic acid	0.00	0.04	0.00
	Citric acid	7.61	9.01	8.00
	Succinic acid	0.00	0.00	1.47

<sup>a-c</sup> Values with the different superscript letters in the same row show significant differences ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 4.9 ภาพถ่ายทางสัณฐานวิทยาของ BC (a) ไอโซเลท K3 ในน้ำสัปดาห์ภายใต้สภาวะ 121 และ (b) โพรไบโอติกร่วมกับไอโซเลท K3 ในน้ำสัปดาห์ภายใต้สภาวะ 121 ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า



ภาพที่ 4.10 IR สเปกตรัมของ BC ผลิตจากไอโซเลท K3 ในน้ำสัปดาห์ภายใต้สภาวะ 121 (BC) และ โพรไบโอติกร่วมกับไอโซเลท K3 ในน้ำสัปดาห์ภายใต้สภาวะ 121 (BC probiotic)

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการประเมินสภาวะการหมักน้ำสับปะรดเพื่อผลิต BC ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างกันผลิต BC ได้ต่างกันภายใต้การหมักด้วยน้ำสับปะรดที่สภาวะเดียวกัน โดยแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่ผลิต BC ได้ปริมาณมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ( $105.10 \pm 0.08$  g/L) คือ *K. xylinus* TISTR428 เมื่อประเมินผลของอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวกับปริมาตรน้ำหมัก (x) ต่อปริมาณ BC ที่ผลิตในน้ำสับปะรด (y) พบว่า ปริมาณ BC ที่ผลิตได้แปรผันโดยตรงกับอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวกับปริมาตรน้ำหมัก โดยมีความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงดังสมการ  $y = 19.422x + 25.936$  ( $R^2 = 0.9346$ ) เมื่อนำ BC ที่ผลิตได้มาวิเคราะห์เนื้อสัมผัสอาหาร พบว่า เมื่ออัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศต่อปริมาตรของน้ำหมักเพิ่มขึ้น Hardness และ Cohesiveness มีค่าลดลง ในขณะที่ Springiness, Gumminess และ Chewiness มีค่าเพิ่มขึ้น

การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิต BC เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ Autochthonous จากน้ำหมักสมุนไพรที่มีส่วนผสมของสับปะรด (Autochthonous) อายุ 8 ปี 5 ปี และ 10 เดือน โดยออกแบบวิธีการคัดแยกเป็น 2 วิธี คือ คัดแยกจากน้ำหมักสมุนไพรโดยตรง และการ Pre-enrichment ด้วยการเติมน้ำสับปะรด 4 รูปแบบ จากนั้นคัดแยกจุลินทรีย์ทุก 2 วัน เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA, GYEA, MRS และ YMA พบ 5, 7 และ 39 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยไอโซเลทที่คัดแยกได้จากน้ำหมักอายุ 10 เดือน มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน 7 รูปแบบ และพบว่า ไอโซเลท K1, K3, K4 และ K8 สามารถผลิตสารคล้าย BC ได้ในน้ำสับปะรด เมื่อระบุชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 16s rRNA ไอโซเลททั้ง 4 พบว่า มีเฉพาะไอโซเลท K3 ที่มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *G. xylinus* 80.16 % อีกทั้งไอโซเลทนี้ยังผลิต BC ได้มีประสิทธิภาพมากกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน (Allochthonous) โดยได้ BC ปริมาณมากกว่าที่เวลาและสภาวะเดียวกัน

การประเมินสภาวะการหมักน้ำสับปะรดด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ Autochthonous ที่คัดเลือก โดยแปรปริมาณแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) แหล่งไนโตรเจน (เพปโทน) และแปรปริมาณสารชักนำ (โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) ทั้งหมด 12 สภาวะ พบว่า การเติมซูโครส 5% (w/v) และเพปโทน 0.5% (w/v) เป็นสภาวะที่แบคทีเรียผลิต BC สูงที่สุด และปริมาณ BC ที่ผลิตได้ในแต่ละ

สภาวะแตกต่างกัน สอดคล้องกับสมบัติทางเคมีของน้ำสับปรดหลังหมักที่แตกต่างกัน โดยเมื่อเทียบกับน้ำสับปรดก่อนหมัก น้ำสับปรดหลังหมักมี TA เพิ่มขึ้น TSS และ pH ลดลง อีกทั้งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น เมื่อทดสอบเนื้อสัมผัสพบว่า เมื่อความเข้มข้นของซูโครสเพิ่มขึ้น ค่า Springiness และ Cohesiveness ลดลง ค่า Hardness และ Gumminess เพิ่มขึ้น นอกจากนี้พบว่า ความชื้นและ  $A_w$  แปรผันตรงกับปริมาณ BC สีของ BC ที่ผลิตได้มีค่า ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) ที่แตกต่างกัน โดยการเติมการเติมเพปโทน และโซเดียมไดไฮโดรเจนพอสเฟตส่งผลให้ค่า  $L^*$  ลดลง

การประเมินการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท K3 ที่คัดเลือกร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 พบว่า K3 ผลิต BC ได้  $26.40 \pm 0.80$  g/L และเป็น young BC และใน BC พบ K3 และ *L. plantarum* FTCU10621 ถูกตรึงไว้ใน BC  $6.59 \pm 0.19$  และ  $8.42 \pm 0.52$  log CFU/g BC ตามลำดับ และในน้ำสับปรดพบ K3 และ *L. plantarum* FTCU10621  $6.12 \pm 0.18$  และ  $8.33 \pm 0.03$  log CFU/ml ตามลำดับ เมื่อพิจารณาองค์ประกอบน้ำสับปรดหลังหมักด้วยวิธี HPLC พบว่า น้ำสับปรดหลังหมักประกอบด้วยกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติก กรดซิตริกกรดซัคซินิก และกรดมาลิก เท่ากับ 28.34, 8.00, 1.47, 0.41 g/L ตามลำดับ น้ำตาลประกอบด้วยฟรักโทส กลูโคส และซูโครส เท่ากับ  $4.63 \pm 14.24$ ,  $4.37 \pm 12.79$ ,  $1.23 \pm 3.59$  g/100 ml ตามลำดับ ค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเพิ่มขึ้นจากก่อนการหมักเป็น  $640.23 \pm 2.36$  mg GAE/L และ  $84.40 \pm 0.05$  % ตามลำดับ

เมื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพของ BC ที่ได้จากการหมักด้วยไอโซเลทร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621 เปรียบเทียบกับ BC ที่ได้จากการหมักด้วยไอโซเลทสายพันธุ์เดียว จากภาพถ่ายทางสัณฐานวิทยาที่กำลังขยาย 5,000 เท่า พบว่า BC ที่ได้จากการหมักร่วมมีเซลล์โพรไบโอติกฝังตัวอยู่ใน BC จำนวน 5 เซลล์ คิดเป็น  $7.08$  log cell/g และเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของ BC ด้วยเทคนิค FTIR พบว่า IR สเปกตรัมของ BC ที่ผลิตได้จากการหมักทั้ง 2 รูปแบบเป็นไปในทางเดียวกัน และมีลักษณะใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม BC ที่ได้จากการหมักร่วมมี IR สเปกตรัมของหมู่ไฮดรอกซิลมี % transmittance ลดลง

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการคัดแยกจุลินทรีย์สายพันธุ์ Autochthonous พบว่า *G. xylinus* (K3) มีศักยภาพในการเป็นสายพันธุ์ทางการค้า เพื่อผลิต BC ในน้ำสับปะรดในระดับอุตสาหกรรมได้ และสามารถเพาะเลี้ยงร่วมกับ Probiotic candidate ในน้ำสับปะรด และสามารถพัฒนาเป็นเครื่องดื่มฟังก์ชันได้ อย่างไรก็ตาม BC ที่ผลิตได้มีปริมาณน้อย ดังนั้นกระบวนการเพื่อที่จะสามารถผลิต BC เมื่อหมักร่วมให้มีปริมาณมากขึ้นเป็นเรื่องที่ต้องศึกษาต่อไป



## บรรณานุกรม

- กฤติยา ไชยนอก. (2561). *ไม่ย่อย อืดอืด ขับเบา บรรเทาด้วยสับปะรด*  
<https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/429/สับปะรด-อาหารไม่ย่อย-ขับเบา/>
- กรมส่งเสริมการเกษตร. (2563). *เกษตรฯ เผยสถานการณ์ผลิตสับปะรดและแนวทางการบริหารจัดการผลผลิต ปี 2564* <https://secreta.doae.go.th/?p=6598>
- ชาญยุทธ กภาพกาญจน์. (2561). *โครงการ การพัฒนาไกล และกระบวนการเพื่อสนับสนุนการวางแผนจัดทำงบประมาณด้านทรัพยากรน้ำและเกษตร โดยใช้ระบบสารสนเทศในการเชื่อมโยงข้อมูลและสนับสนุน จังหวัดระยอง.*
- อรอง จันท์ประสาทสุข. (2562). *การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และเคมีจำเพาะของเนื้อผลสับปะรด. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.*
- มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา. (2561). *กระบวนการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสับปะรด. (เชียงใหม่: สถาบันถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชน)*
- สถาบันวิจัยพืชสวน. (2560). *ถิ่นกำเนิด ความสำคัญ และสถานการณ์ (Vol. 1). การจัดการการผลิตสับปะรดคุณภาพ.*
- ณัฐสร้อย สายชนะ. (2558). *แบคทีเรียอะซิติก : สรีรวิทยาและการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม. ว. วิทย. เทคโนโลยี. หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ, 1, 75-89.*
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2564). *ข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหาร.*
- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. (2563). *สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2564.*
- ปราณี อ่านเปรื่อง. (2541). *ทฤษฎีการผลิตน้ำผลไม้บรรจุขวดพร้อมดื่ม และความรู้เกี่ยวกับการขอขึ้นทะเบียนตำรับอาหาร และใบอนุญาตตั้งโรงงานผลิตอาหาร (Vol. 28).*
- (AOAC), A. o. O. A. C. (2000). *Official methods of analysis.* Washington, DC: AOAC
- Adebayo-Tayo, B. C., Akintunde, M. O., & Sanusi, J. F. (2017). Effect of different fruit juice media on bacterial cellulose production by *Acinetobacter* sp. BAN1 and *Acetobacter pasteurianus* PW1. *Journal of Advances in Biology and Biotechnology, 14(3), 1-9.*
- Adnan, A., Nair, G. R., Lay, M. C., Swan, J. E., & Umar, R. (2015). Glycerol as a cheaper carbon source in bacterial cellulose (BC) production by *Gluconacetobacter*

- xylinus* DSM46604 in batch fermentation system. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 19(5), 1131 - 1136.
- Akoğlu, A., Çakır, İ., Akoğlu, İ. T., Karahan, A. G., & Çakmakçı, M. L. (2015). Effect of bacterial cellulose as a fat replacer on some quality characteristics of fat reduced sucuk. *Gıda: The Journal of Food*, 40(3), 133-139.
- Andriani, D., Apriyana, A. Y., & Karina, M. (2020). The optimization of bacterial cellulose production and its applications: A review. *Cellulose*, 27(12), 6747-6766.
- Azeredo, H. M., Barud, H., Farinas, C. S., Vasconcellos, V. M., & Claro, A. M. (2019). Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 7.
- Bae, S., & Shoda, M. (2004). Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. *Biotechnology Progress*, 20(5), 1366-1371.
- Bae, S., Sugano, Y., & Shoda, M. (2004). Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(1), 33-38.
- Beliah, M., Ibrahim, H., M Farag, A., El-Ahwany, A., & Sabry, S. (2020). Utilization of marine algae as a carbon source for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24(6), 497-518.
- Brown, A. J. (1886). XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 49, 432-439.
- Cakar, F., Katı, A., Özer, I., Demirbağ, D. D., Şahin, F., & Aytekin, A. Ö. (2014). Newly developed medium and strategy for bacterial cellulose production. *Biochemical Engineering Journal*, 92, 35-40.
- Caro-Astorga, J., Walker, K. T., Herrera, N., Lee, K.-Y., & Ellis, T. (2021). Bacterial cellulose spheroids as building blocks for 3D and patterned living materials and for regeneration. *Nature Communications*, 12(1), 1-9.
- Cavka, A., Guo, X., Tang, S.-J., Winstrand, S., Jönsson, L. J., & Hong, F. (2013). Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fiber sludge. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1-10.



- Chanprasartsuk, O.-o., & Prakitchaiwattana, C. (2022). Growth kinetics and fermentation properties of autochthonous yeasts in pineapple juice fermentation for starter culture development. *International Journal of Food Microbiology*, 371, 109636.
- Chen, S.-Q., Meldrum, O. W., Liao, Q., Li, Z., Cao, X., Guo, L., Zhang, S., Zhu, J., & Li, L. (2021). The influence of alkaline treatment on the mechanical and structural properties of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 271, 118431.
- Cheng, K.-C., Catchmark, J. M., & Demirci, A. (2011). Effects of CMC addition on bacterial cellulose production in a biofilm reactor and its paper sheets analysis. *Biomacromolecules*, 12(3), 730-736.
- Cielecka, I., Szustak, M., Kalinowska, H., Gendaszewska-Darmach, E., Ryngajłto, M., Maniukiewicz, W., & Bielecki, S. (2019). Glycerol-plasticized bacterial nanocellulose-based composites with enhanced flexibility and liquid sorption capacity. *Cellulose*, 26(9), 5409-5426.
- Çoban, E. P., & Biyik, H. (2011). Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5. *African Journal of Biotechnology*, 10(27), 5346-5354.
- Davoodi, S., Behbahani, M., Shirani, E., & Mohabatkar, H. (2016). Influence of sucrose, glucose, stevia leaf and stevioside on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus casei*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 40(4), 275-279.
- De Ley, J., & Frateur, J. (1970). The status of the generic name *Gluconobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 20(1), 83-95.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, P., Corsetti, A., Gaenzle, M., Ciati, R., & Gobbetti, M. (2006). Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 54(26), 9873-9881.
- Dourado, F., Fontão, A., Leal, M., Rodrigues, A. C., & Gama, M. (2016). Process modeling and techno-economic evaluation of an industrial bacterial nanocellulose fermentation process. In *Bacterial Nanocellulose* (pp. 199-214). Elsevier.
- Du, R., Zhao, F., Peng, Q., Zhou, Z., & Han, Y. (2018). Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* isolated from

- Chinese persimmon vinegar. *Carbohydrate Polymers*, 194, 200-207.
- El-Salam, S. S. A. (2012). Bacterial cellulose of kombucha mushroom tea. *New York Science Journal*, 5(4).
- Faridah, F., Diana, S., Helmi, H., Sami, M., & Mudliana, M. (2013). Effect of sugar concentrations on bacterial cellulose production as cellulose membrane in mixture liquid medium and material properties analysis. ASEAN/Asian Academic Society International Conference Proceeding Series,
- Feng, Y., Zhang, X., Shen, Y., Yoshino, K., & Feng, W. (2012). A mechanically strong, flexible and conductive film based on bacterial cellulose/graphene nanocomposite. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 644-649.
- Gayathry, G. (2015). Production of nata de coco-a natural dietary fibre product from mature coconut water using *Gluconacetobacter xylinum* (sju-1). *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 5(2), 231-235.
- Halib, N., Amin, M., & Ahmad, I. (2012). Physicochemical properties and characterization of nata de coco from local food industries as a source of cellulose. *Sains Malaysiana*, 41(2), 205-211.
- Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory methods in food microbiology*. Gulf Professional Publishing.
- Hashimoto, T., & Koizumi, S. (2012). Combined small-angle scattering for characterization of hierarchically structured polymer systems over nano-to-micron meter: Part I Experiments. In (Vol. 2, pp. 381-398).
- Ida, I. M. (2017). Bacterial cellulose as secondary metabolite: production, processing, and applications. In *Plant Secondary Metabolites, Volume One* (pp. 189-220). Apple Academic Press.
- Jagannath, A., Manjunatha, S., Ravi, N., & Raju, P. (2011). The effect of different substrates and processing conditions on the textural characteristics of bacterial cellulose (nata) produced by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Food Process Engineering*, 34(3), 593-608.
- Jaramillo L, R., Tobio J, W., & Escamilla M, J. (2012). Effect of sucrose in the production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* in static culture. *Revista MVZ Cordoba*, 17(2), 3004-3013.

- Ji, K., Wang, W., Zeng, B., Chen, S., Zhao, Q., Chen, Y., Li, G., & Ma, T. (2016). Bacterial cellulose synthesis mechanism of facultative anaerobe *Enterobacter* sp. FY-07. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.
- Johari, N., Ahmad, I., & Halib, N. (2012). Comparison study of hydrogels properties synthesized with micro-and nano-size bacterial cellulose particles extracted from nata de coco. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 26(4), 399-404.
- Junqueira, J. C., Jorge, A., Barbosa, J., Rossoni, R., Vilela, S., Costa, A., Primo, F., Gonçalves, J., Tedesco, A., & Suleiman, J. (2012). Photodynamic inactivation of biofilms formed by *Candida* spp., *Trichosporon mucoides*, and *Kodamaea ohmeri* by cationic nanoemulsion of zinc 2, 9, 16, 23-tetrakis (phenylthio)-29H, 31H-phthalocyanine (ZnPc). *Lasers in Medical Science*, 27(6), 1205-1212.
- Junsangree, P., Srikamsukh, P., & Pankhaw, W. (2002). Substitution of coconut juice by pineapple juice in Nata de coco-pina production. *Warasan Kaset*.
- Karahan, A. G., Akoğlu, A., Çakır, İ., Kart, A., Çakmakçı, M. L., Uygun, A., & Göktepe, F. (2011). Some properties of bacterial cellulose produced by new native strain *Gluconacetobacter* sp. A06O2 obtained from Turkish vinegar. *Journal of Applied Polymer Science*, 121(3), 1823-1831.
- Keshk, S., & Sameshima, K. (2006). The utilization of sugar cane molasses with/without the presence of lignosulfonate for the production of bacterial cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 291-296.
- Kim, S.-Y., Kim, J.-N., Wee, Y.-J., Park, D.-H., & Ryu, H.-W. (2006). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 isolated from persimmon vinegar. Twenty-seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals,
- Kornmann, H., Duboc, P., Marison, I., & von Stockar, U. (2003). Influence of nutritional factors on the nature, yield, and composition of exopolysaccharides produced by *Gluconacetobacter xylinus* I-2281. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 6091-6098.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jeziarska, A., Gonçalves-Miśkiewicz, M., Turkiewicz, M., & Bielecki, S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4),

189-195.

- Lim, Y. W., Park, M. s., Park, J. y., & Choi, E. w. (2013). *Komagataeibacter sp. SFCB22-18 strain and methods of the production of bacterial cellulose* (South Korea Patent No. KR20140130569A).
- Lin, W.-C., Lien, C.-C., Yeh, H.-J., Yu, C.-M., & Hsu, S.-h. (2013). Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, *94*(1), 603-611.
- Liu, J., Wang, S., Jiang, L., & Shao, W. (2021). Production and characterization of antimicrobial bacterial cellulose membranes with non-leaching activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *103*, 232-238.
- Liu, M., Li, S., Xie, Y., Jia, S., Hou, Y., Zou, Y., & Zhong, C. (2018). Enhanced bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* via expression of *Vitreoscilla* hemoglobin and oxygen tension regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(3), 1155-1165.
- Liu, M., Liu, L., Jia, S., Li, S., Zou, Y., & Zhong, C. (2018). Complete genome analysis of *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955 for elucidating bacterial cellulose biosynthesis and metabolic regulation. *Scientific Reports*, *8*(1), 1-10.
- Lustri, W. R., Barud, H., Barud, H. d. S., Peres, M. F., Gutierrez, J., Tercjak, A., De Oliveira, O. B., & Ribeiro, S. J. L. (2015). Microbial cellulose—biosynthesis mechanisms and medical applications. *Cellulose-Fundamental Aspects and Current Trends*, *1*, 133-157.
- Matsushita, K., Toyama, H., Tonouchi, N., & Okamoto-Kainuma, A. (2016). Acetic acid bacteria. *Ecology and Physiology. Japan: Springer*.
- Mesomya, W., Komindr, S., Leelahakul, P., Cuptapun, Y., Hengsawadi, D., Tammarate, P., & Tangkanakul, P. (2008). *Effects of health food from cereal and nata de coco on serum lipids in human*. Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University.
- Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dykes, G., & Gidley, M. (2009). Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(2), 576-583.
- Mohammad, S. M., Rahman, N., Khalil, M. S., & Abdullah, S. R. S. (2014). An overview of

- biocellulose production using *Acetobacter xylinum* culture. *Advances in Biological Research*, 8(6), 307-313.
- Mohammadkazemi, F., Azin, M., & Ashori, A. (2015). Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate Polymers*, 117, 518-523.
- Mohd Ali, M., Hashim, N., Abd Aziz, S., & Lasekan, O. (2020). Pineapple (*Ananas comosus*): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. *Food Research International*, 137, 109675.
- Moniri, M., Boroumand Moghaddam, A., Azizi, S., Abdul Rahim, R., Bin Ariff, A., Zuhainis Saad, W., Navaderi, M., & Mohamad, R. (2017). Production and status of bacterial cellulose in biomedical engineering. *Nanomaterials*, 7(9), 257.
- Moosavi, N. M., & Yousefi, A. (2011). Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* from agricultural waste. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9(2), 94-101.
- Morgan, J. L., McNamara, J. T., & Zimmer, J. (2014). Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(5), 489-496.
- Musino, D., Rivard, C., Landrot, G., Novalés, B., Rabilloud, T., & Capron, I. (2021). Hydroxyl groups on cellulose nanocrystal surfaces form nucleation points for silver nanoparticles of varying shapes and sizes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 584, 360-371.
- Nagashima, A., Tsuji, T., & Kondo, T. (2016). A uniaxially oriented nanofibrous cellulose scaffold from pellicles produced by *Gluconacetobacter xylinus* in dissolved oxygen culture. *Carbohydrate Polymers*, 135, 215-224.
- Nakai, T., Tonouchi, N., Konishi, T., Kojima, Y., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Sakai, F., & Hayashi, T. (1999). Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(1), 14-18.
- Nguyen, B. T., Bujna, E., Fekete, N., Tran, A. T., Rezessy-Szabo, J. M., Prasad, R., & Nguyen, Q. D. (2019). Probiotic beverage from pineapple juice fermented with

- Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Frontiers in Nutrition*, 6, 54.
- Nguyen, V. T., Flanagan, B., Gidley, M. J., & Dykes, G. A. (2008). Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Current Microbiology*, 57(5), 449-453.
- Niyazbekova, Z. T., Nagmetova, G. Z., & Kurmanbayev, A. (2018). An overview of bacterial cellulose applications. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*(2).
- Nurtjahtja, K. (2020). The effect of *Acetobacter xylinum* starter in waste liquid pineapple peel on the properties of Nata de Pina. *International Journal of Ecophysiology*, 2(02), 86-91.
- Phruksaphithak, N., Kaewnun, C., & Sompong, O. (2019). Bacterial cellulose production and applications. *Science, Engineering and Health Studies*, 1-7.
- Pogorelova, N., Rogachev, E., Digel, I., Chernigova, S., & Nardin, D. (2020). Bacterial cellulose nanocomposites: Morphology and mechanical properties. *Materials*, 13, 2849.
- Prabhu, G., Bhat, D., Bhat, R. M., & Selvaraj, S. (2022). A critical look at bioproducts co-cultured under solid state fermentation and their challenges and industrial applications. *Waste and Biomass Valorization*, 1-17.
- Quijano, L. (2017). *Embracing bacterial cellulose as a catalyst for sustainable fashion (Senior Honors Thesis)*
- Raiszadeh-Jahromi, Y., Reza zadeh-Bari, M., Almasi, H., & Amiri, S. (2020). Optimization of bacterial cellulose production by *Komagataeibacter xylinus* PTCC 1734 in a low-cost medium using optimal combined design. *Journal of Food Science and Technology*, 57(7), 2524-2533.
- Revin, V. V., Nazarova, N. B., Tsareva, E. E., Liyaskina, E. V., Revin, V. D., & Pestov, N. A. (2020). Production of bacterial cellulose aerogels with improved physico-mechanical properties and antibacterial effect. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 603407.
- Rizzi, G. P. (2004). Role of phosphate and carboxylate ions in Maillard browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4), 953-957.
- Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J. M., & Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic

- acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3), 79-90.
- Römbling, U., & Galperin, M. Y. (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: Diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends in Microbiology*, 23(9), 545-557.
- Ruka, D. R., Simon, G. P., & Dean, K. M. (2012). Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 613-622.
- Santos, S. M., Carbajo, J. M., Quintana, E., Ibarra, D., Gomez, N., Ladero, M., Eugenio, M. E., & Villar, J. C. (2015). Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration. *Carbohydrate Polymers*, 116, 173-181.
- Santosa, B., Wignyanto, W., Hidayat, N., & Sucipto, S. (2020). The quality of nata de coco from sawarna and mapanget coconut varieties to the time of storing coconut water. *Food Research*, 4(4), 957-963.
- Schirmer, T., & Jenal, U. (2009). Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nature Reviews Microbiology*, 7(10), 724-735.
- Shah, N., Ul-Islam, M., Khattak, W. A., & Park, J. K. (2013). Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydrate Polymers*, 98(2), 1585-1598.
- Shi, L. H., Balakrishnan, K., Thiagarajah, K., Ismail, N. I. M., & Yin, O. S. (2016). Beneficial properties of probiotics. *Tropical Life Sciences Research*, 27(2), 73.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 945-948.
- Singh, O., Panesar, P. S., & Chopra, H. K. (2017). Isolation and characterization of cellulose producing bacterial isolate from rotten grapes. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 14(1), 373-380.
- Sriplai, N., Sirima, P., Palaporn, D., Mongkolthananuk, W., Eichhorn, S. J., & Pinitsoontorn, S. (2018). White magnetic paper based on a bacterial cellulose nanocomposite. *Journal of Materials Chemistry*, 6(42), 11427-11435.
- Sun, S., Ding, Y., Liu, M., Xian, M., & Zhao, G. (2020). Comparison of glucose, acetate and ethanol as carbon resource for production of poly (3-hydroxybutyrate) and other acetyl-CoA derivatives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8,

833.

- Torres, F. G., Commeaux, S., & Troncoso, O. P. (2012). Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. *Journal of Functional Biomaterials*, 3(4), 864-878.
- Trulove, S. (2008). *Invention Controls Weavers of Nanoscale Biomaterials*.
- Ullah, M. W., Manan, S., Kiprono, S. J., Ul-Islam, M., & Yang, G. (2019). Synthesis, structure, and properties of bacterial cellulose. *Nanocellulose: from Fundamentals to Advanced Materials*, 81-113.
- Vatakit, T., Leenanon, B., & Chanhom, S. (2017). Survival of acid shocked and Nata De Pina immobilized probiotic bacteria. *Khon Kaen Agricultural Journal*, 45(4), 625-632.
- Vora, J., Jain, N., & Modi, H. (2015). Identification and characterization of pigment producing strain Kocuria KM243757 & JO1 KM216829 from Kharaghoda soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(9), 850-859.
- Wang, Z., Feng, Y., Yang, N., Jiang, T., Xu, H., & Lei, H. (2022). Fermentation of kiwifruit juice from two cultivars by probiotic bacteria: Bioactive phenolics, antioxidant activities and flavor volatiles. *Food Chemistry*, 373, 131455.
- Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6(1), 11. 1.1-11. 1.8.
- Yamada, Y., & Kondo, K. (1984). *Gluconoacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 30(4), 297-303.
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., & Nakagawa, Y. (2012). Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the  $\alpha$ -Proteobacteria. *Annals of Microbiology*, 62(2), 849-859.
- Zahan, K. A., Pa'e, N., & Muhamad, I. I. (2015). Monitoring the effect of pH on bacterial cellulose production and *Acetobacter xylinum* 0416 growth in a rotary discs reactor. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40(7), 1881-1885.
- Zhang, T., Shen, Y., Zhang, S., Xie, Z., Cheng, X., Li, W., & Zhong, C. (2021). Monosaccharide removal and effects of *Komagataeibacter xylinus* fermentation



on antioxidant capacity and flavor profile of Chinese wolfberry juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(10), e15800.

Zhang, W., Wang, X., Qi, X., Ren, L., & Qiang, T. (2018). Isolation and identification of a bacterial cellulose synthesizing strain from kombucha in different conditions: *Gluconacetobacter xylinus* ZHCJ618. *Food science and biotechnology*, 27(3), 705-713.

Zhong, C. (2020). Industrial-scale production and applications of bacterial cellulose. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 605374.

Zubaidah, E., Yurista, S., & Rahmadani, N. R. (2018, March). Characteristic of physical, chemical, and microbiological kombucha from various varieties of apples. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 131, No. 1, p. 012040). IOP Publishing.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ภาคผนวก ก

## การระบุสายพันธุ์แบคทีเรียไอโซเลทด้วยวิธีอณูจุลชีววิทยา

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 16s ribosomal RNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ดัดแปลงวิธีของ Vora et al. (2015) นำ DNA ที่สกัดได้มา 10-50 ng/  $\mu\text{L}$  เพื่อผสมกับ master mix reagent ได้แก่ 10x Vi buffer, nuclease-free water, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$  dNTPs mix, 5 U/ $\mu\text{L}$  Tag DNA, 10  $\mu\text{M}$  forward ไพร์เมอร์ 357F (5'-CTC CTA CGG GAG GCA GC AG-3') และ 10  $\mu\text{M}$  reverse ไพร์เมอร์ 517R (5'ATT ACC GCG GCT GG-3') ปริมาณตามตาราง ก.1 จากนั้นทำ PCR reaction ตามสภาวะในตารางที่ ก. 2 และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ PCR (PCR amplicon) ด้วย agarose gel (2 % (w/v)) electrophoresis

ตารางที่ ก.1 ปริมาณ master mix reagent

Reagent	Concentration		Volume ( $\mu\text{L}$ )
	Stock	Working	Working (50 $\mu\text{L}/\text{rxn}$ )
Vi buffer	10X	1X	5
$\text{MgCl}_2$	50 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs mix	10 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{M}$	0.5
Primer (Forward)	10 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{M}$	0.5
Primer (Reverse)	10 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{M}$	0.5
Tag DNA	5 U/ $\mu\text{L}$	2 U/ $\mu\text{L}$	0.4
nuclease-free water	-	-	36.6
Template (Sample)	-	10-50 ng/ $\mu\text{L}$	5

ตารางที่ ก.2 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ )	เวลา	cycle
1 Initial denaturation	94	2 min	-
2 Denaturation	94	30 sec	-
3 Annealing	55	30 sec	-
4 Extension	72	30 sec	-
5 Go to step 2 to 4	-	-	35
6 Final extention	72	7 min	-

## ภาคผนวก ข

### การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (Total phenolic content, TPC): Folin–Ciocalteu method ดัดแปลงวิธีจาก Waterhouse (2001)

#### 1. การเตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิก

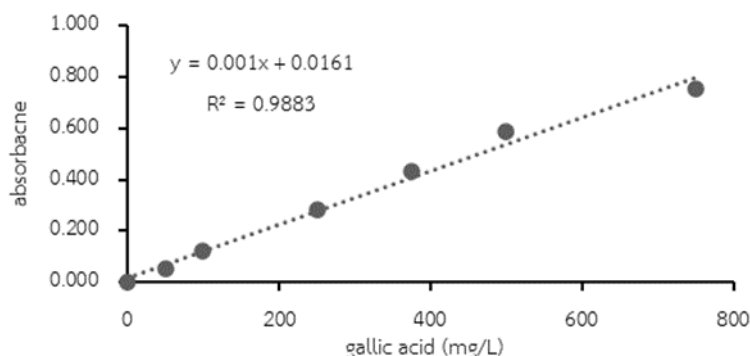
เตรียมกรดแกลลิก 5 g/l โดยละลายกรดแกลลิก 0.5 กรัม ใน 100 % (v/v) เอทานอล และปรับให้มีปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเตรียมกรดแกลลิกความเข้มข้น 50, 100, 250, 375, 500 และ 750 mg/l ด้วยการเติมกรดแกลลิก 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1.0 และ 1.5 ml 5 g/l ตามลำดับ ในขวดกำหนดปริมาตร และปรับให้มีปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยน้ำกลั่น

#### 2. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

ละลาย Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 g และปรับให้มีปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยน้ำกลั่น

#### 3. วัดปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

เติม 0.1 ml ของตัวอย่าง/สารมาตรฐานแกลลิก/น้ำกลั่น(blank) ในหลอดทดลอง เจือจางด้วยน้ำกลั่น 7.9 ml จากนั้นเติม Folin–Ciocalteu reagent 0.5 ml ผสมให้เข้ากันด้วย vortex และบ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จึงเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1.5 ml ผสมให้เข้ากันด้วย vortex และบ่มในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm สร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก จะได้สมการเส้นตรง  $y = 0.001x + 0.0161$  ( $R^2 = 0.9883$ ) สำหรับหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในตัวอย่างในหน่วย mg GAE/l ดังภาพที่ ข.1 โดยการแทนค่า y ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง คำนวณหา x ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในตัวอย่างในหน่วย mg GAE/l



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity ดัดแปลงจาก Shimada et al., 1992

1. การเตรียมสารมาตรฐาน DPPH

ละลาย DPPH 0.004 g ใน 100% เอทานอลปริมาตร 100 ml

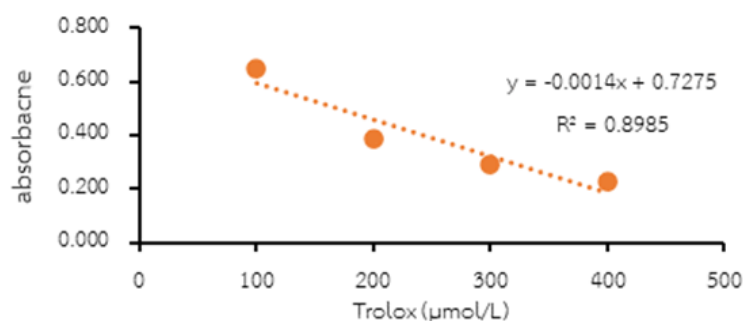
2. การเตรียมสารมาตรฐาน Trolox

เตรียม 500  $\mu$ M Trolox โดยละลาย Trolox 0.0031 g ใน 100% เอทานอลปริมาตร 25 ml และเจือจางเป็น 100, 200, 300 และ 400  $\mu$ M ด้วยน้ำกลั่น

3. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เติม 0.5 ml ของตัวอย่าง/สารมาตรฐาน Trolox/เอทานอล(blank) ในหลอดทดลอง เติม สารมาตรฐาน DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM 5 ml ผสมให้เข้ากันด้วย vortex และบ่มในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm สร้างกราฟมาตรฐาน Trolox ดังภาพที่ ข.2 และคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสูตร

DPPH radical scavenging activity = [(blank absorbance - sample absorbance)/blank absorbance] x 100



ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐาน Trolox

## ภาคผนวก ค

## โครมาโทแกรมการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของน้ำหมักด้วยวิธี HPLC

โครมาโทแกรมการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบกรดอินทรีย์ของน้ำหมักด้วยวิธี HPLC

เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์: Agilent HPLC 1100 Series

เงื่อนไขการวิเคราะห์

Column: Zorbax NH2 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ M

Column Temp.: Not control

Flow rate: 1.5 ml/min

Detector: RI Detector

Injector volume: 20  $\mu$ l

Mobile phase: Acetonitril: DI water ratio 80:20



Method C:\HPCHEM\1\METHODS\OR\_ACID.M

 =====  
 Calibration Table  
 =====

Calib. Data Modified : 4/5/2022 1:56:41 PM

Calculate : External Standard  
Based on : Peak Area

Rel. Reference Window : 15.000 %  
Abs. Reference Window : 0.000 min  
Rel. Non-ref. Window : 15.000 %  
Abs. Non-ref. Window : 0.000 min  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Sample Amount : 0.00000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs  
Uncalibrated Peaks : not reported  
Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated  
Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear  
Origin : Included  
Weight : Equal

Recalibration Settings:  
Average Response : Average all calibrations  
Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :  
Printout of recalibrations within a sequence:  
Calibration Table after Recalibration  
Normal Report after Recalibration  
If the sequence is done with bracketing:  
Results of first cycle (ending previous bracket)

Signal 1: DAD1 A, Sig=210,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [g/L]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.966	1	5.00000e-1	105.43785	4.74213e-3	Malic acid
	2	2.00000	423.49863	4.72257e-3	
	3	5.00000	1084.84387	4.60896e-3	
	4	10.00000	2185.28394	4.57606e-3	
4.723	1	5.00000e-1	75.18773	6.65002e-3	Lactic acid
	2	2.00000	209.10912	9.56438e-3	
	3	5.00000	540.56091	9.24965e-3	
	4	10.00000	1077.29956	9.28247e-3	
4.976	1	5.00000e-1	105.81222	4.72535e-3	Acetic acid
	2	2.00000	181.96907	1.09909e-2	
	3	5.00000	455.78662	1.09700e-2	
	4	10.00000	880.96973	1.13511e-2	
7.218	1	5.00000e-1	134.63898	3.71363e-3	Citric acid
	2	2.00000	436.89651	4.57774e-3	
	3	5.00000	1105.43079	4.52312e-3	
	4	10.00000	2692.19409	3.71444e-3	
7.819	1	5.00000e-1	106.45332	4.69689e-3	Succinic acid
	2	2.00000	258.07800	7.74959e-3	
	3	5.00000	635.89368	7.86295e-3	
	4	10.00000	2285.94434	4.37456e-3	

2 Warnings or Errors :

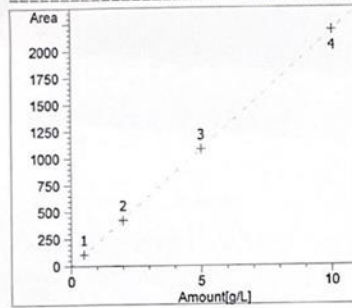
Warning : Overlapping peak time windows at 4.723 min, signal 1  
Warning : Overlapping peak time windows at 7.218 min, signal 1

 =====  
 Peak Sum Table  
 =====

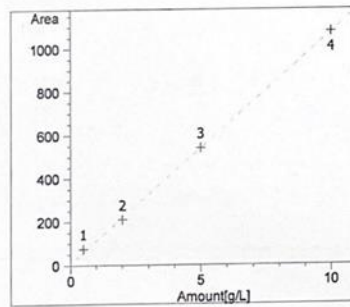
Method C:\HPCHEM\1\METHODS\OR\_ACID.M

\*\*\*No Entries in table\*\*\*

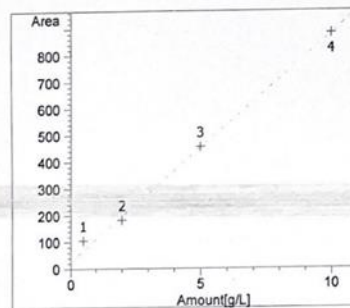
## Calibration Curves



Malic acid at exp. RT: 3.966  
 DAD1 A, Sig=210,4 Ref=360,100  
 Correlation: 0.99998  
 Residual Std. Dev.: 6.49332  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 218.82426  
 b: -6.07206  
 x: Amount [g/L]  
 y: Area



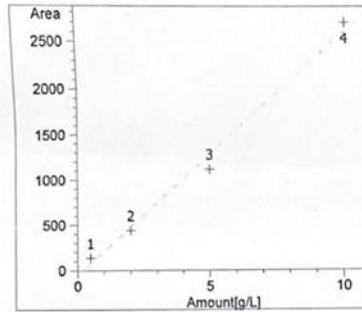
Lactic acid at exp. RT: 4.723  
 DAD1 A, Sig=210,4 Ref=360,100  
 Correlation: 0.99974  
 Residual Std. Dev.: 11.58331  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 106.97149  
 b: 6.03123  
 x: Amount [g/L]  
 y: Area



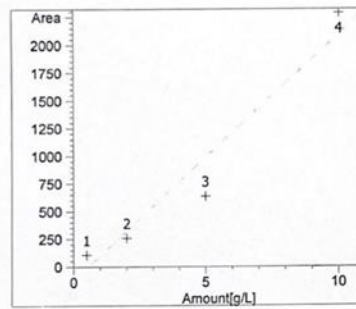
Acetic acid at exp. RT: 4.976  
 DAD1 A, Sig=210,4 Ref=360,100  
 Correlation: 0.99772  
 Residual Std. Dev.: 27.56640  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 85.58225  
 b: 25.36966  
 x: Amount [g/L]  
 y: Area



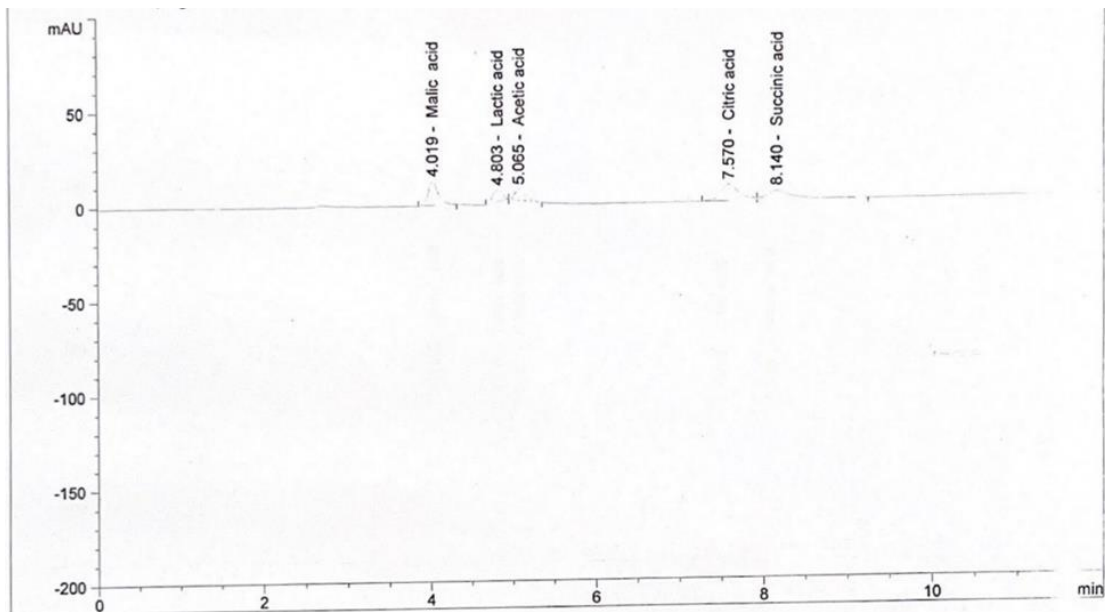
METHOD C:\AFCHEN\1\METHODS\OR\_ACID.M



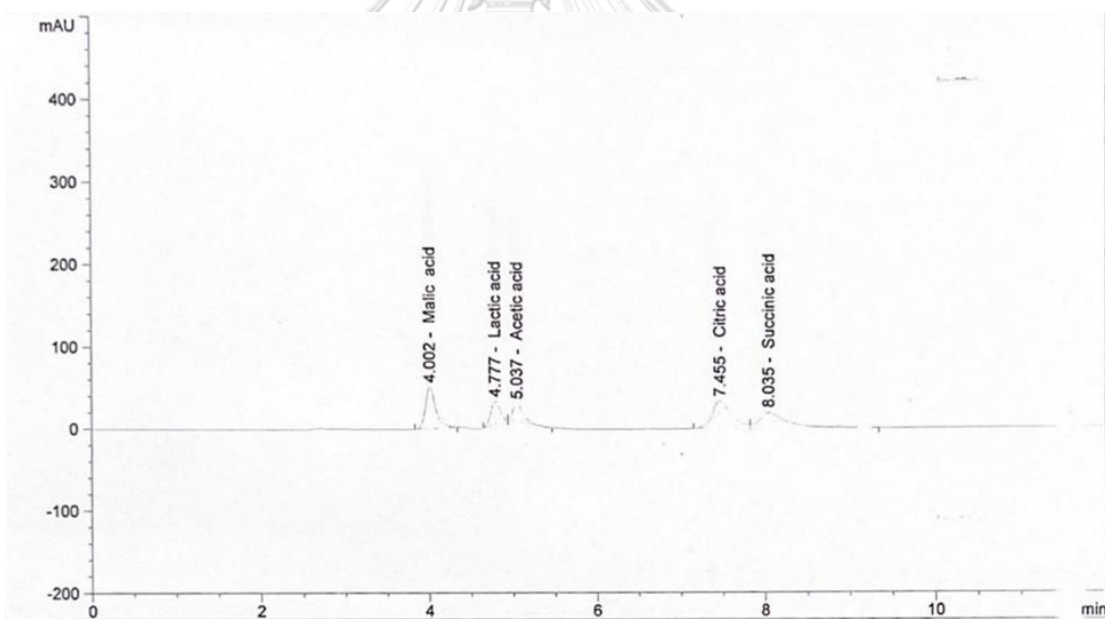
Citric acid at exp. RT: 7.218  
DAD1 A, Sig=210,4 Ref=360,100  
Correlation: 0.99545  
Residual Std. Dev.: 121.34356  
Formula:  $y = mx + b$   
m: 266.14921  
b: -57.69015  
x: Amount [g/L]  
y: Area



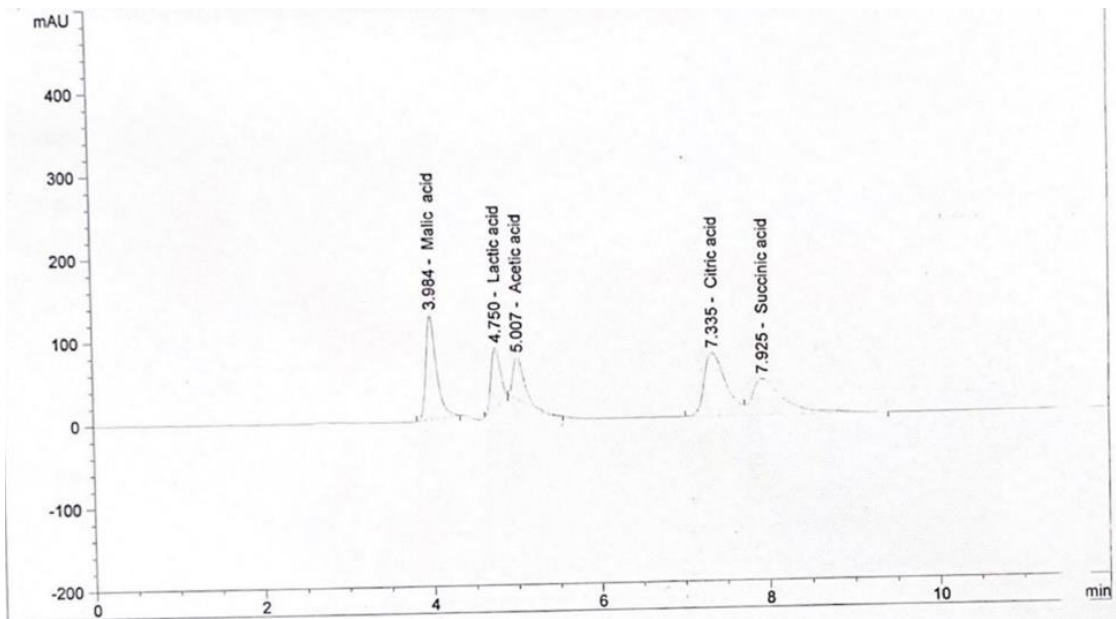
Succinic acid at exp. RT: 7.819  
DAD1 A, Sig=210,4 Ref=360,100  
Correlation: 0.97256  
Residual Std. Dev.: 253.00851  
Formula:  $y = mx + b$   
m: 222.14708  
b: -120.24093  
x: Amount [g/L]  
y: Area



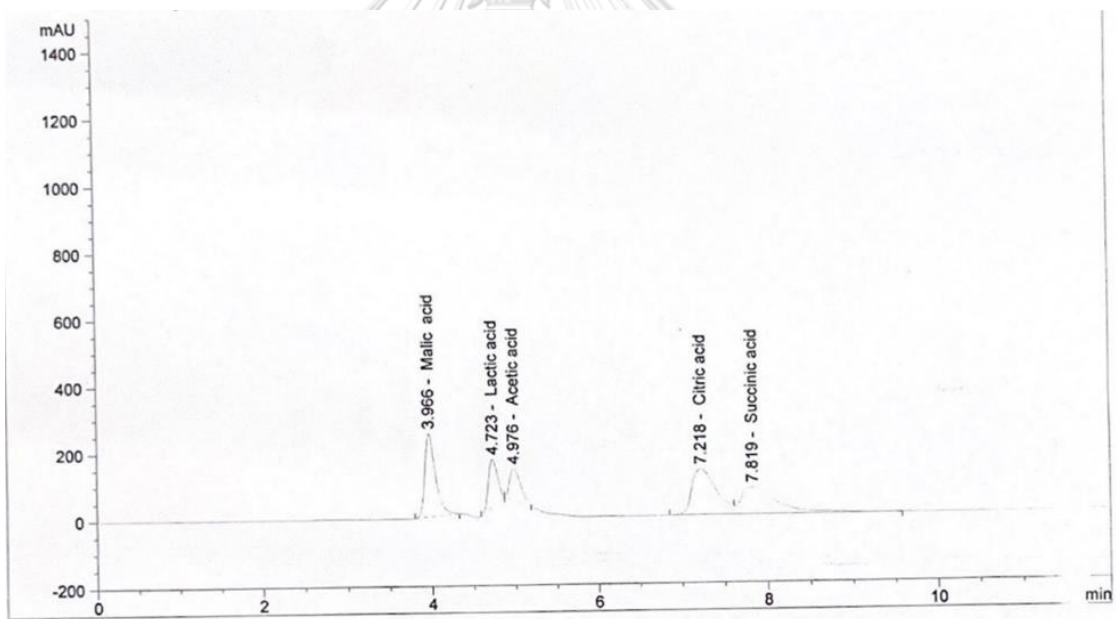
ภาพที่ ค.1 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานกรดอินทรีย์ 0.5 g/L



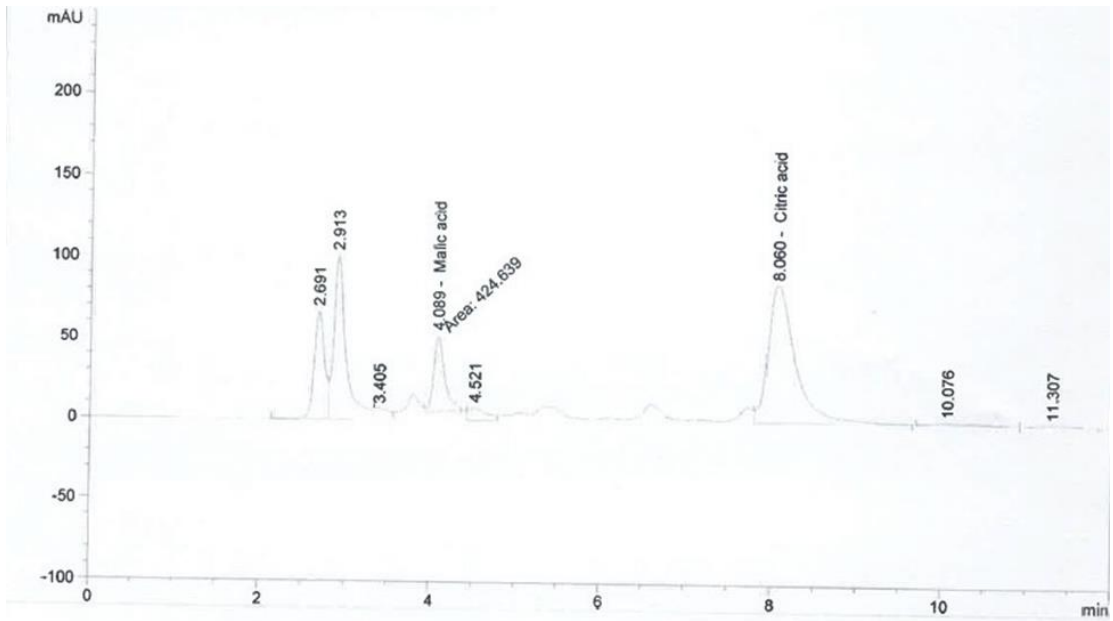
ภาพที่ ค.2 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานกรดอินทรีย์ 2.0 g/L



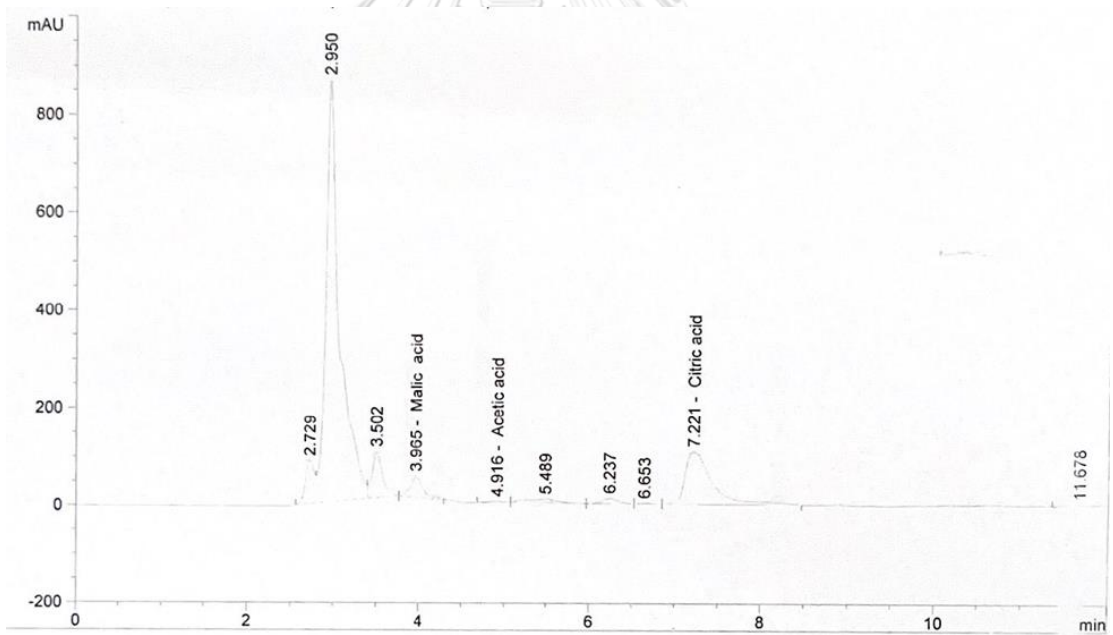
ภาพที่ ค.3 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานกรดอินทรีย์ 5.0 g/L



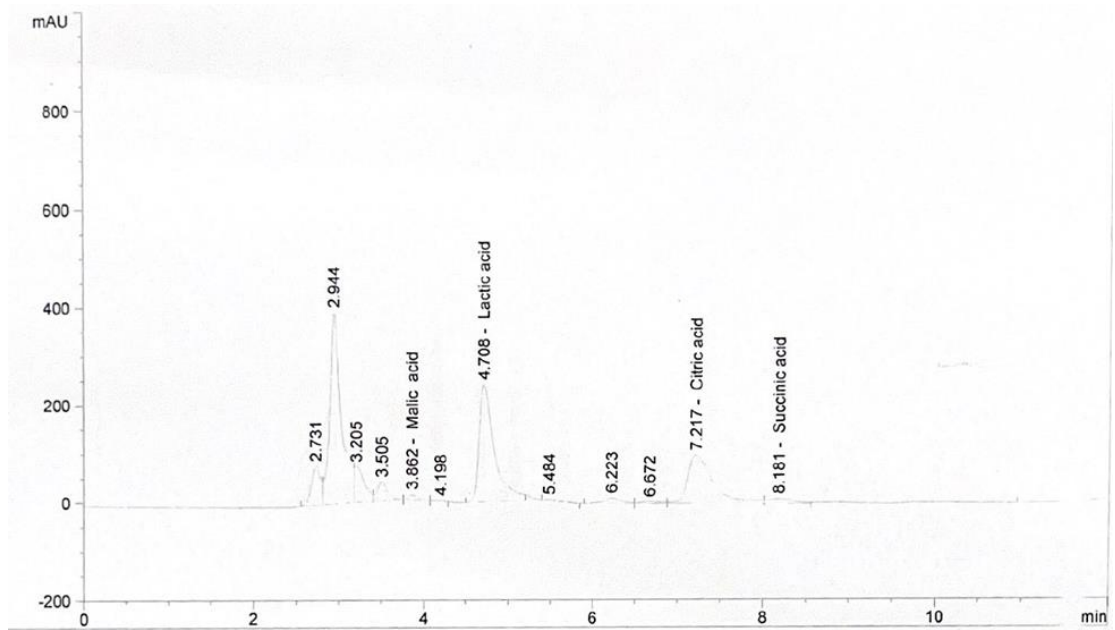
ภาพที่ ค.4 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานกรดอินทรีย์ 10.0 g/L



ภาพที่ ค.5 โครมาโทแกรมกรดอินทรีย์ของน้ำสับปรดก่อนหมัก



ภาพที่ ค.6 โครมาโทแกรมกรดอินทรีย์ของน้ำสับปรดหลังหมักด้วยไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดียว



ภาพที่ ค.7 โครมาโทแกรมกรดอินทรีย์ของน้ำสับปรดหลังหมักด้วยไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621

โครมาโทแกรมการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบน้ำตาลของน้ำหมักด้วยวิธี HPLC

เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์: Agilent HPLC 1100 Series

เงื่อนไขการวิเคราะห์

Column: Mightysil RP18 4.6 x 150 mm, 5  $\mu$ M

Column Temp.: Not control

Flow rate: 1.0 ml/min

Detector: RI Detector

Injector Volume: 5  $\mu$ l

Mobile phase A: 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2

Mobile Phase B: -



Method C:\HPCHEM\1\METHODS\SUGAR(T).M\SUGAR(T).M

```

=====
                        Calibration Table
=====

```

Total sugar

```

Calib. Data Modified : 4/7/2022 4:40:20 PM

Calculate : External Standard
Based on : Peak Area

Rel. Reference Window : 10.000 %
Abs. Reference Window : 0.000 min
Rel. Non-ref. Window : 10.000 %
Abs. Non-ref. Window : 0.000 min
Multiplier : 10.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 0.00000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Uncalibrated Peaks : not reported
Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear
Origin : Included
Weight : Equal

Recalibration Settings:
Average Response : Average all calibrations
Average Retention Time: Floating Average New 75%

```

Calibration Report Options :

```

Printout of recalibrations within a sequence:
  Calibration Table after Recalibration
  Normal Report after Recalibration
If the sequence is done with bracketing:
  Results of first cycle (ending previous bracket)

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime	Lvl	Amount	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
[min]	Sig	[g/100mL]			
5.949	1	1 5.00000e-2	4.82782e4	1.03567e-6	Fructose
		2 1.00000e-1	8.25655e4	1.21116e-6	
		3 5.00000e-1	4.89342e5	1.02178e-6	
		4 7.00000e-1	6.74235e5	1.03821e-6	
		5 1.00000	9.84389e5	1.01586e-6	
6.729	1	1 5.00000e-2	4.59726e4	1.08761e-6	Glucose
		2 1.00000e-1	5.41000e4	1.84843e-6	
		3 5.00000e-1	4.73442e5	1.05610e-6	
		4 7.00000e-1	6.43276e5	1.08818e-6	
		5 1.00000	9.06406e5	1.10326e-6	
9.696	1	1 5.00000e-2	3.86155e4	1.29482e-6	Sucrose
		2 1.00000e-1	9.21007e4	1.08577e-6	
		3 5.00000e-1	4.64797e5	1.07574e-6	
		4 7.00000e-1	6.88374e5	1.01689e-6	
		5 1.00000	1.01838e6	9.81953e-7	

```

=====
                        Peak Sum Table
=====

```

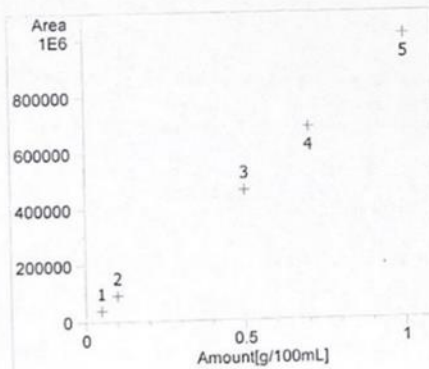
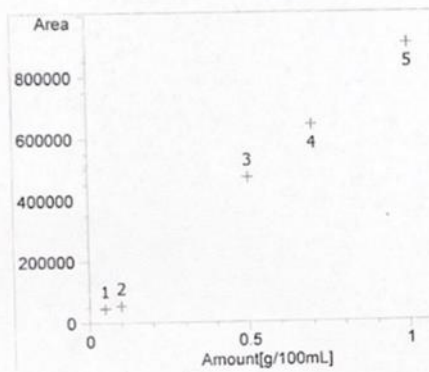
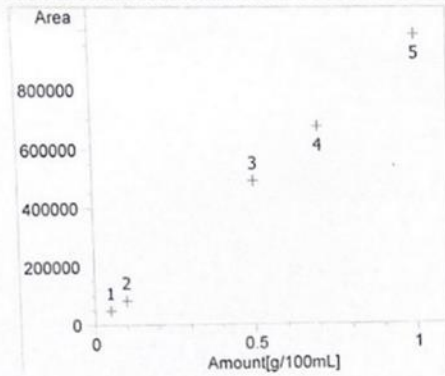
```

***No Entries in table***
=====

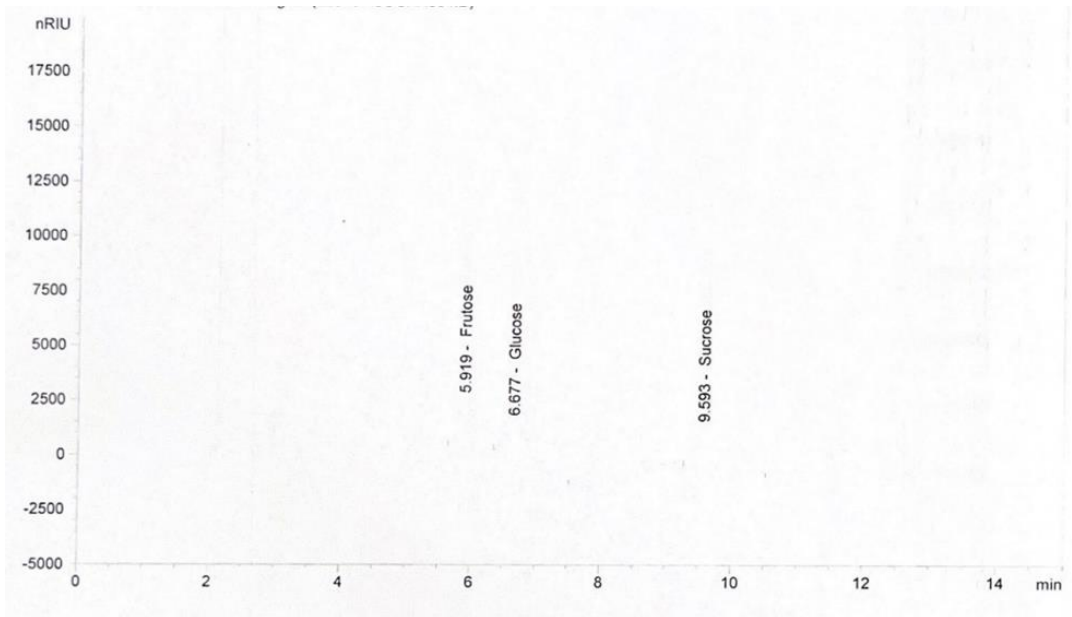
```

Method C:\HPCHEM\1\METHODS\SUGAR(T).M\SUGAR(T).M

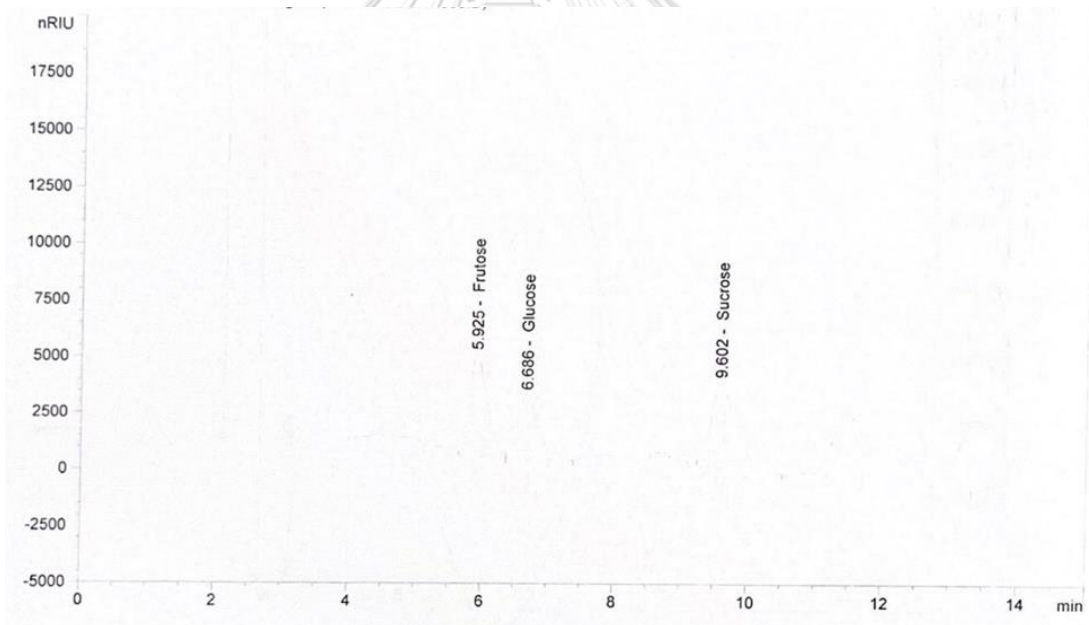
=====  
 Calibration Curves  
 =====



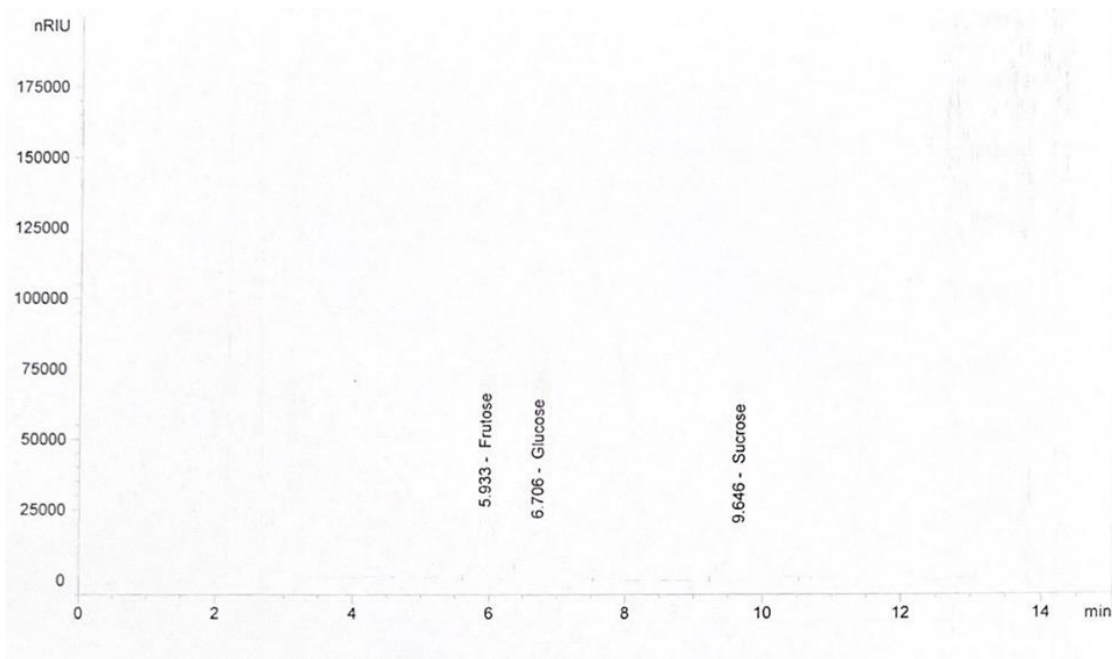




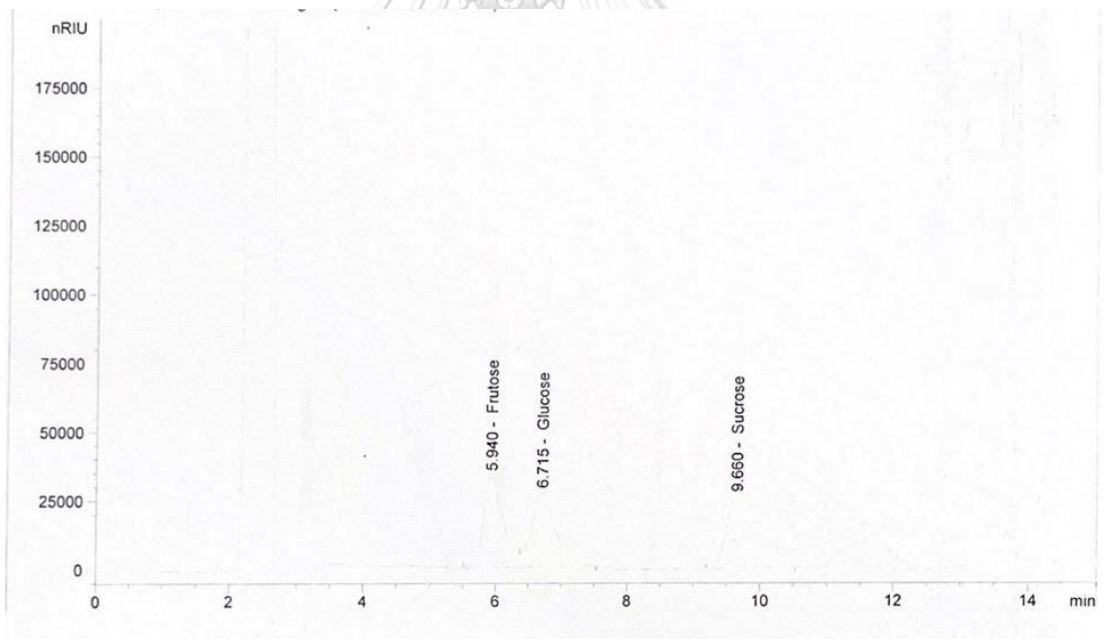
ภาพที่ ค.8 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานน้ำตาล 0.05 g/L



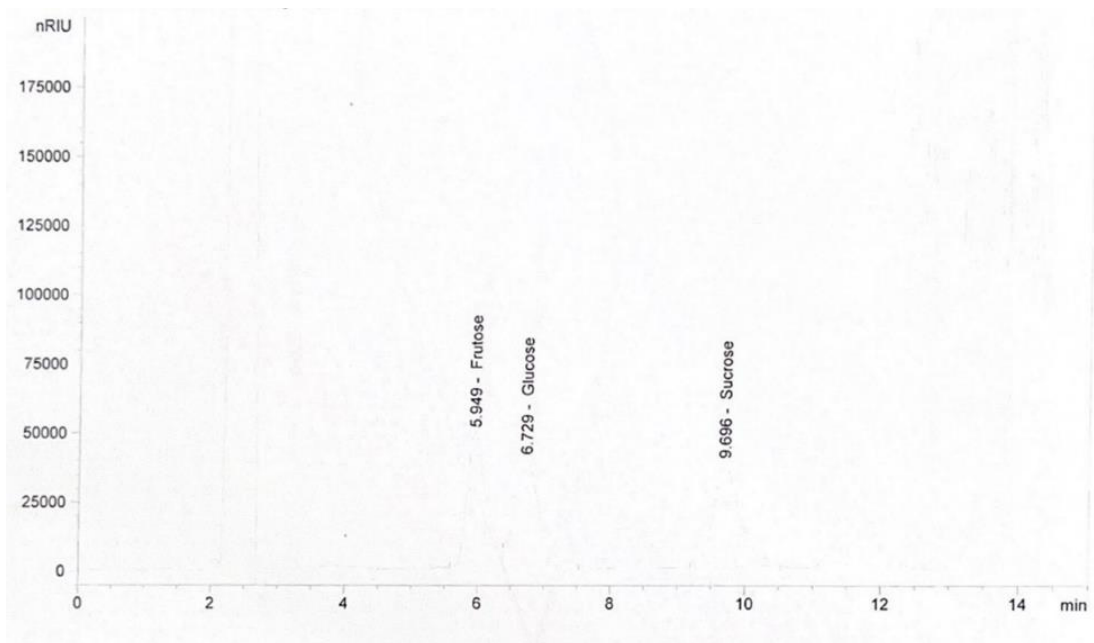
ภาพที่ ค.9 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานน้ำตาล 0.1 g/L



ภาพที่ ค.10 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานน้ำตาล 0.5 g/L

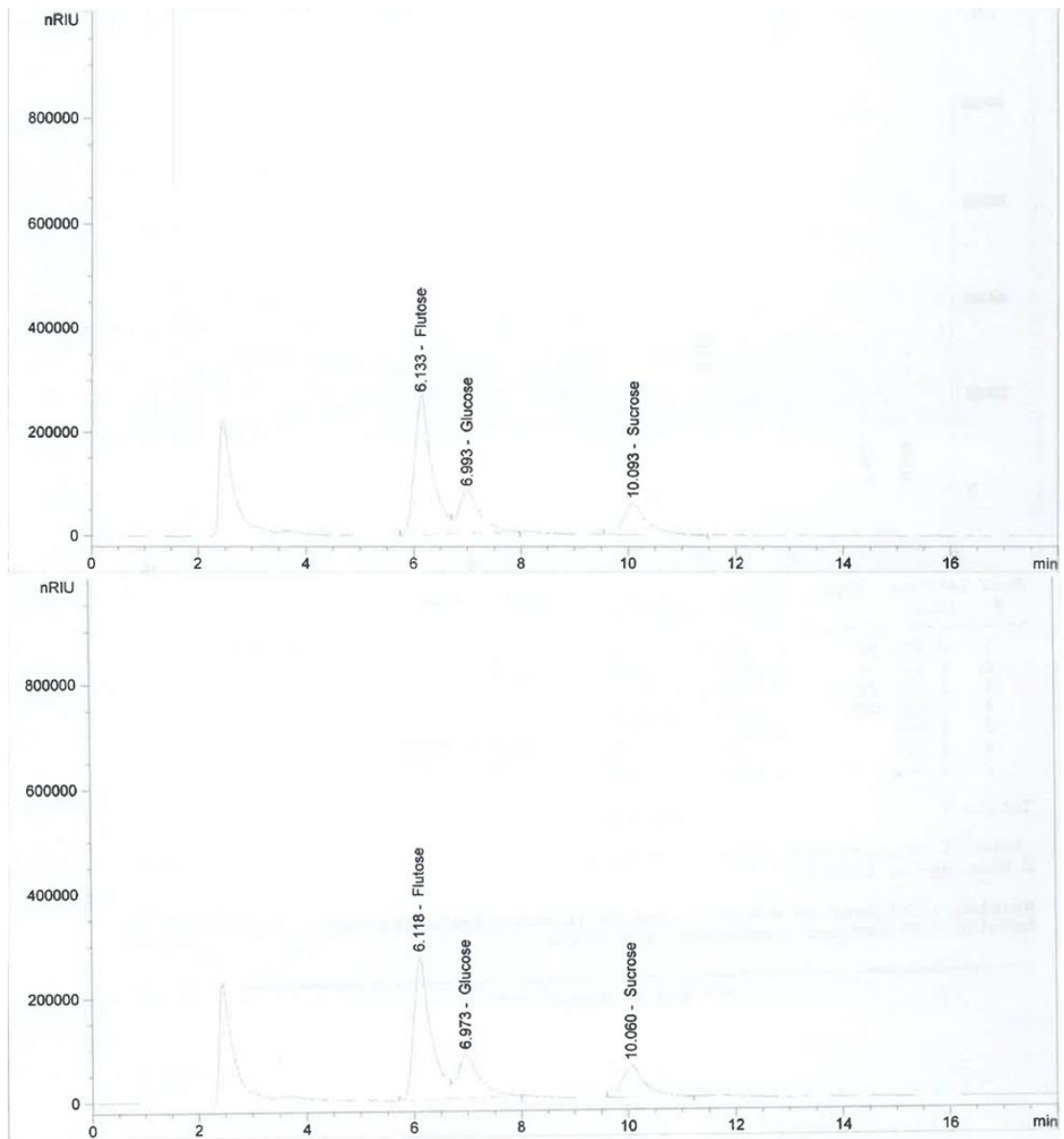


ภาพที่ ค.11 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานน้ำตาล 0.7 g/L

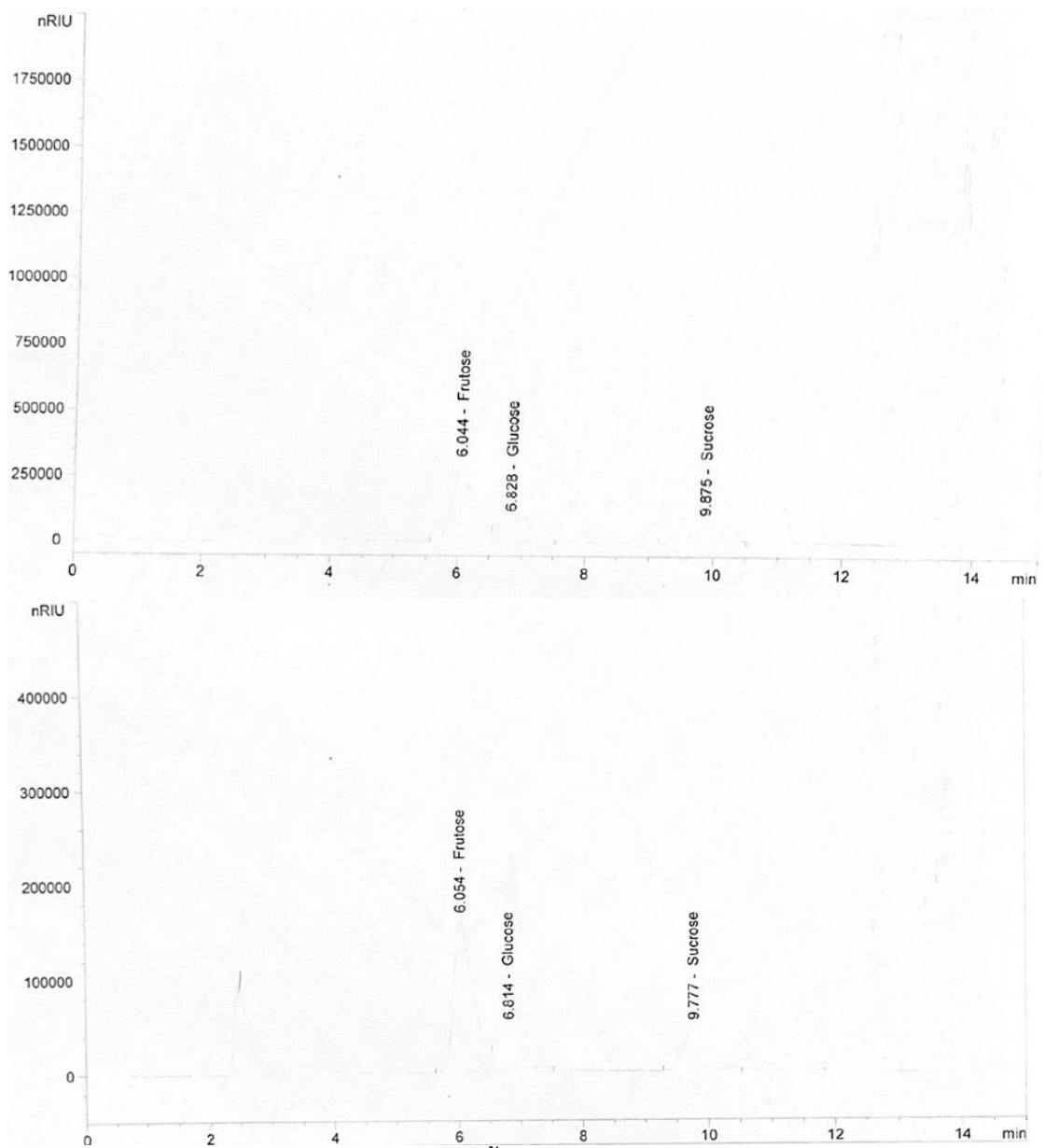


ภาพที่ ค.12 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานน้ำตาล 1.0 g/L

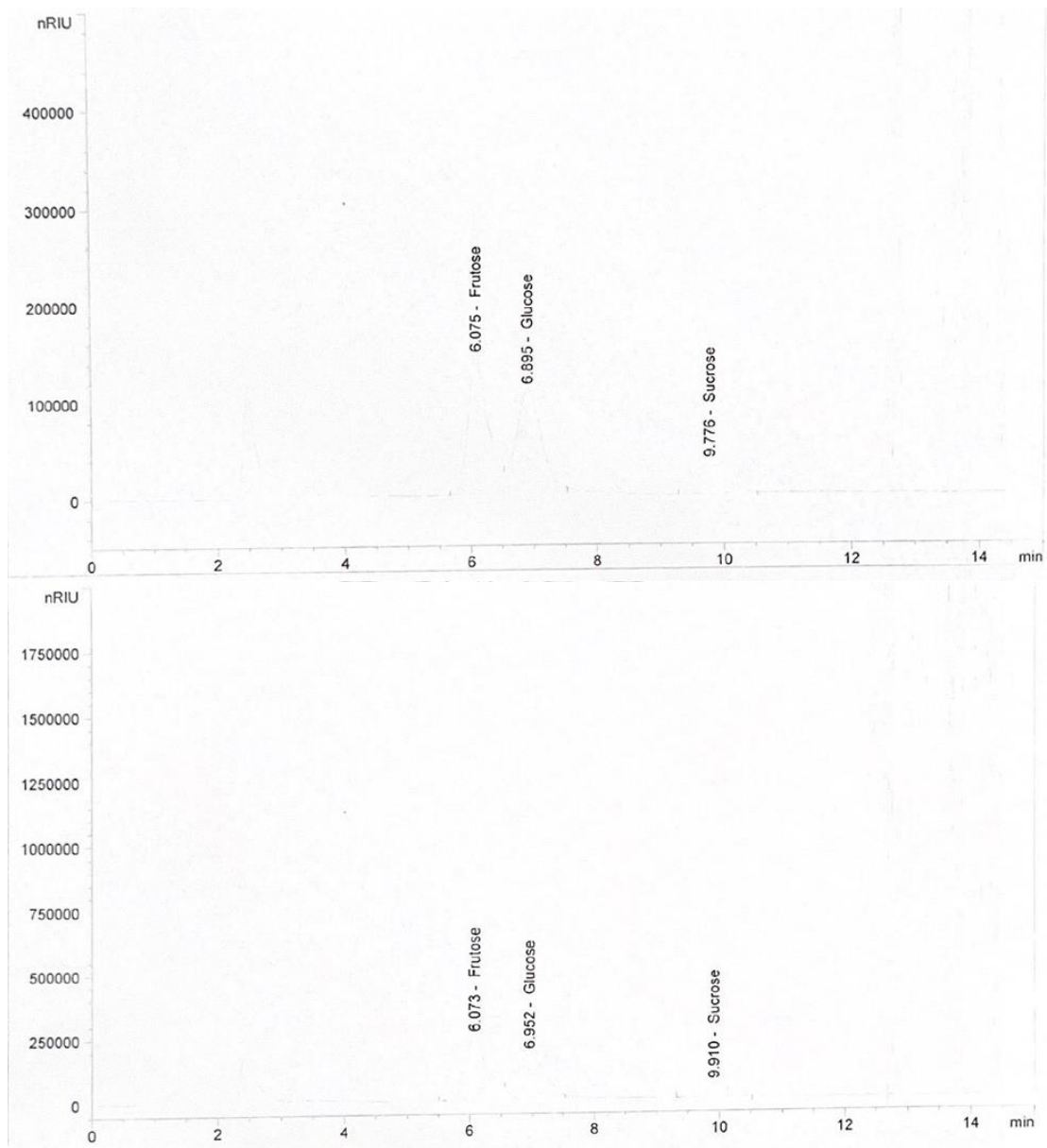




ภาพที่ ค.13 โครมาโทแกรมน้ำตาลของน้ำสับปรดก่อนหมัก

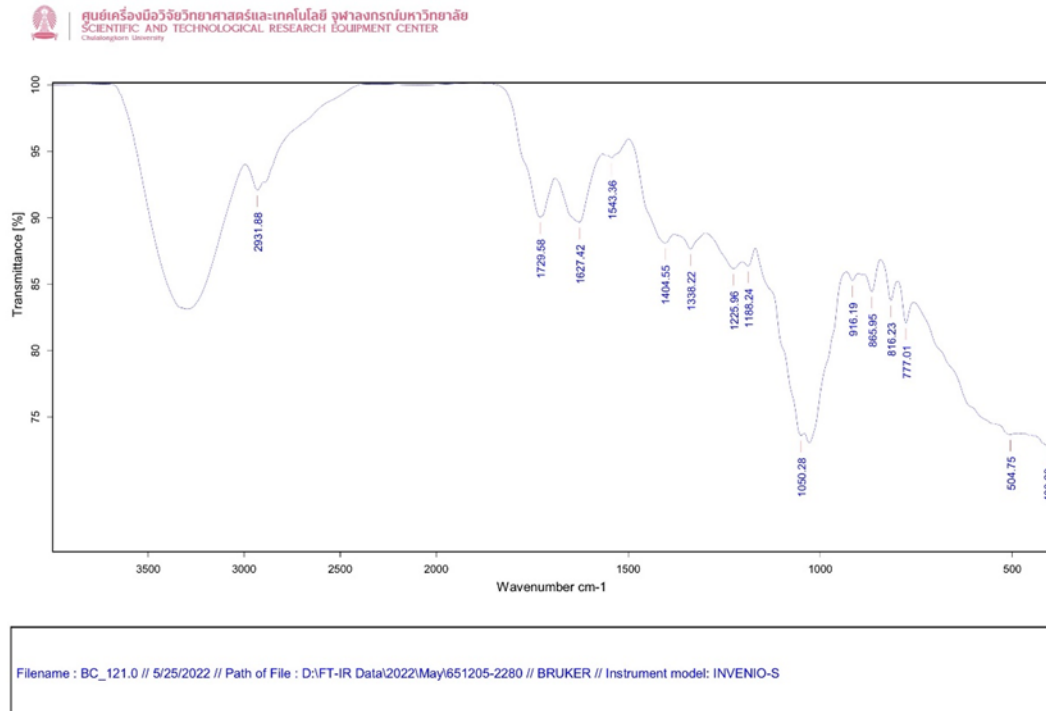


ภาพที่ ค.14 โครมาโทแกรมกรดอินทรีย์ของน้ำสับประรดหลังด้วยหมักไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดียว

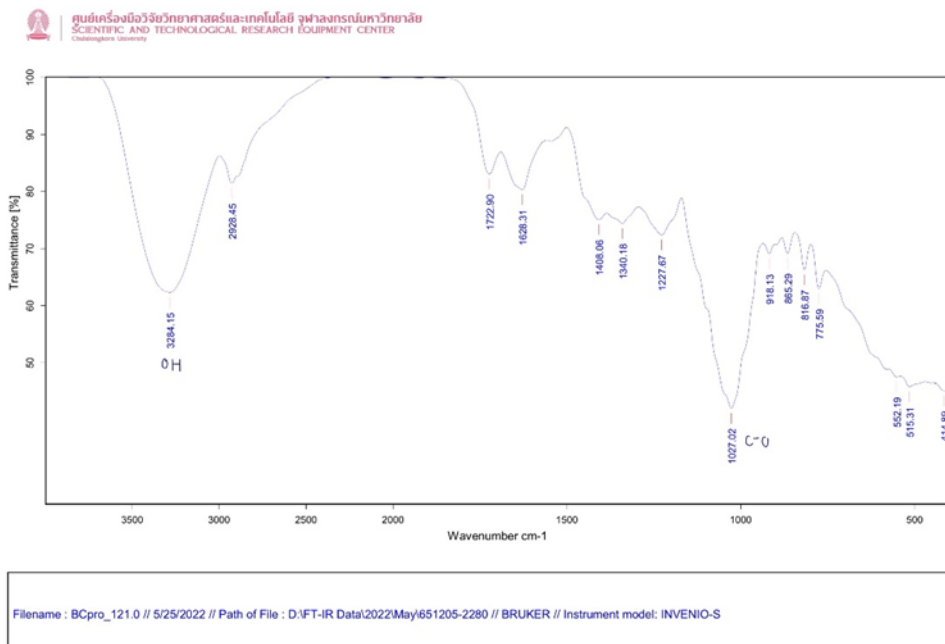


ภาพที่ ค.15 โครมาโทแกรมกรดอินทรีย์ของน้ำสับปรดหลังด้วยหมักไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621

ภาคผนวก ง  
สเปกตรัม IR ของ BC



ภาพที่ ง.1 สเปกตรัม IR ของ BC หลังหมักด้วยไอโซเลท K3 สายพันธุ์เดียว



ภาพที่ ง.2 สเปกตรัม IR ของ BC หลังหมักด้วยไอโซเลท K3 ร่วมกับ *L. plantarum* FTCU10621

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	
วัน เดือน ปี เกิด	18 สิงหาคม 2541
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากสาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2562 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2563
ที่อยู่ปัจจุบัน	149 ถนนเสนานิคม 1 ซอย 13 แขวงเสนานิคม เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900
ผลงานตีพิมพ์	Chayaporn Thanthithum, Cheunjit Prakitchaiwattana and Chaleeda Borompichaichartkul. 2022. Altering surface area of fermenters and volume of pineapple juice for enhancing bacterial cellulose production and property with selected strains. ในงานประชุมระดับนานาชาติ The 24th Food Innovation Asia Conference 2022 (FIAC 2022) Food Innovation and sustainable development of functional ingredients and materials : Benefits, concerns and challenges in human health and well-being.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY