



การผลิตและประเมินคุณลักษณะของนาโนแบคทีเรียเซลลูโลส
จาก *Komagataeibacter nataicola* โดยใช้ น้ำข้าวข้าว



โดย
นายพิพัฒน์ สุธยิ๊ง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร



การผลิตและประเมินคุณลักษณะของนาโนแบคทีเรียลเซลลูโลส
จาก *Komagataeibacter nataicola* โดยใช้ น้ำข้าวข้าว



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF NANO BACTERIAL CELLULOSE
FROM *KOMAGATAEIBACTER NATAICOLA* USING WATER FROM WASHING RICE



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)
Department of BIOTECHNOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2017
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การผลิตและประเมินคุณลักษณะของนาโนแบคทีเรียลเซลลูโลส
	จาก <i>Komagataeibacter nataicola</i> โดยใช้ น้ำข้าวข้าว
โดย	พิพัฒน์ สุดยิ่ง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพชนก จตุรพิริย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ดร. สิ้นธุ์วัฒน์ ฤทธิธรรม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพชนก จตุรพิริย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา วัฒนการุณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติศักดิ์ จตุรพิริย์)

58401207 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

คำสำคัญ : แบคทีเรียลเซลลูโลส, น้ำข้าวข้าว, "*Komagataeibacter nataicola*"

นาย พิพัฒน์ สุดยิ่ง: การผลิตและประเมินคุณลักษณะของนาโนแบคทีเรียลเซลลูโลส จาก *Komagataeibacter nataicola* โดยใช้ข้าวข้าว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์

แบคทีเรียลเซลลูโลส เป็นผลิตภัณฑ์ได้จากแบคทีเรียบางชนิด มีความบริสุทธิ์สูง มีประสิทธิภาพสำหรับนำไปใช้ในทางการแพทย์และในอุตสาหกรรมต่าง ๆ งานวิจัยนี้คัดแยกแบคทีเรียผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากผลไม้ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร YE และ Schramm and Hestrin (SH) ตลอดจน ประเมินสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยใช้น้ำข้าวข้าว (water from washing rice; WWR) ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง YE และวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยา โครงสร้างทางเคมี ความเป็นผลึก และความบริสุทธิ์ของแบคทีเรียลเซลลูโลส โดยเทคนิค SEM, FT-IR, XRD และ DSC ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ Li1 คัดแยกได้จากแอปเปิ้ล (*Malus pumila*) ถูกจำแนกเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง YE ได้มากกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง SH ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร คือ ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 13 วัน อย่างไรก็ตาม พบว่า *K. Nataicola* ไม่สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้เพิ่มขึ้น เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตและผงวุ้นในอาหารเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ *K. Nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียลเซลลูโลสไม่แตกต่างกัน แต่สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง YE ได้มากกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง WWR เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเขย่า และจากการวิเคราะห์ด้วย SEM พบว่า ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลส ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า เท่ากับ 31, 49 และ 24 นาโนเมตร ตามลำดับ มีค่าดัชนีความเป็นผลึกของแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่งและแบบเขย่าคิดเป็น 72, 68, 80 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยโครงสร้างทางเคมีของแบคทีเรียลเซลลูโลสไม่มีความแตกต่างกัน และพบความบริสุทธิ์ของแบคทีเรียลเซลลูโลสในช่วง 140-149 องศาเซลเซียส ในขณะที่แบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง YE ในสภาวะเพาะเลี้ยงแบบเขย่าเท่ากับ 111 องศาเซลเซียส จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า น้ำข้าวข้าวสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต้นทุนต่ำแทนกลูโคส เพื่อผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย *K. Nataicola* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

58401207 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : Bacterial cellulose, Water from washing rice, "Komagataeibacter nataicola"

MR. PIPAT SUDYING : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF NANO BACTERIAL CELLULOSE FROM *KOMAGATAEIBACTER NATAICOLA* USING WATER FROM WASHING RICE THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR PHIMCHANOK JATURAPIREE, Dr. nat. techn.

Bacterial cellulose (BC) produced by some bacteria receives ample of attention due to its high purity and robust cellulose that could be used in medicine and industrial practices. This study aimed to screen bacteria capable of producing BC from fruits, and to optimize the BC production from the screened bacteria in traditional YE and Schramm and Hestrin (SH) media. The glucose-replacing water from washing rice (WWR) without pretreatment as the sole carbon source in YE medium, was also investigated for BC production. The morphology, chemical structure, crystallinity and purity of BC were then characterized using SEM, FT-IR, XRD and DSC techniques. Results stated that the bacterial strain Li1 isolated from apple (*Malus pumila*) was identified as *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) nataicola*. *K. nataicola* produced significantly more BC with YE medium than with SH medium in static culture. The optimum conditions for BC production in WWR-based medium at 4 g/L of total sugar were found to be 5% (v/v) inoculum at initial pH 4.5 and temperature of 25 °C for 13 days of incubation. However, the BC production was not increased by adding CaCO₃ and agar to the medium. Moreover, the weight yield of dry BC film in WWR-based and YE media was not significantly different in static culture, but produced more significantly in YE medium than obtained in WWR medium in agitated culture condition. SEM analysis revealed that average diameters of BC in WWR and YE media in static culture and in WWR-based medium in agitated culture condition were 31, 49 and 24 nm, respectively. The crystallinity index of BC in WWR and YE media in static culture and in agitated culture were approximately 72, 68, 80 and 57%, respectively. The varieties of BC showed no significantly different chemical structure. The purity of BC was in the range of 140-149 °C, whereas that in YE medium in agitated culture was lower at 111 °C. This study shows the suitability of WWR as the low-cost carbon substrate for BC production by *K. nataicola*.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากท่านอาจารย์ รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ ซึ่งเป็นทั้งอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และเปรียบเสมือน เป็นมารดาอีกท่านหนึ่งของผู้วิจัย เป็นผู้ให้ทั้งคำปรึกษา คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และการแก้ปัญหา ต่างๆ ตลอดจนถึงแนะแนวทางแก้ไขข้อบกพร่องที่เกิดขึ้น ทั้งในด้านงานวิจัย และการใช้ชีวิตส่วนตัวของผู้วิจัย อีกทั้งยังตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งใจ และสำนึกในพระคุณของท่านอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สตินัฐวัฒน์ ฤทธิธรรม ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิตา วัฒนการุณ อาจารย์ที่ ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติศักดิ์ จตุรพิริย์ ผู้ทรงคุณวุฒิสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาชี้แนะแนวทาง และให้คำแนะนำเพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จ สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันชัย เลิศวิจิตรจรัส ภาควิชาวิทยาการและ วิศวกรรมวัสดุ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่มอบวิชา ความรู้อันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างมาก จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และ เทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่านที่มอบวิชาความรู้ขั้นพื้นฐานในการนำมา ประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัย ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ อันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็น อย่างมาก และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์อีกหลายท่านที่ได้กล่าวนามในที่นี้ ซึ่งเป็นผู้ให้การศึกษา อบรมสั่งสอน และประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัย รวมทั้งได้แต่งตำราเพื่อให้ผู้วิจัยได้ใช้ศึกษา ค้นคว้า อ้างอิง จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ตลอดจนความสะดวกในการดำเนินการด้าน เอกสารต่าง ๆ จนกระทั่งงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่านที่ให้ความ ช่วยเหลือในการดำเนินงานด้านเอกสารต่าง ๆ และขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ขับรถประจำคณะ วิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม ที่ให้ความสะดวกในการติดต่อดำเนินงานวิจัยนอกสถานที่ จนกระทั่งงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จ

ขอขอบคุณกัลยาณมิตรของผู้วิจัยทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยโดยตลอดมา ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำในหลาย ๆ เรื่องที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัย รวมทั้งช่วยสร้างให้เกิดบรรยากาศที่ดีภายในห้องแล็บ ขอขอบคุณนางสาวชนิกานต์ ศรีนาค (เคย) เพื่อนปริญญาโท หลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือ และสอนใช้เครื่องมือในการทำวิจัย ที่สำคัญขอขอบคุณเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาโทรุ่นเดียวกัน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่สอนโปรแกรมต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัย และยังคงดูแล คอยให้กำลังใจ ในวันที่ท้อจากเรื่องงานวิจัย และเรื่องส่วนตัวด้วยความปรารถนาดีเสมอมา ขอขอบคุณอารม (วิษณุ ศรีสุวรรณ) ซึ่งเป็นเพื่อนคนหนึ่งที่ทำให้ผู้วิจัยตัดสินใจเรียนต่อปริญญาโท จนกระทั่งประสบความสำเร็จ

และที่สำคัญยิ่งขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสุพจน์ คุณแม่ฉลวย คุณย่าฉ้วน สุดยิ่ง ที่ท่านช่วยสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัยมาตั้งแต่วัยเยาว์ ให้ความรัก ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจที่สำคัญมาโดยตลอด ถึงแม้ในวันนี้คุณแม่ไม่ได้ได้เห็นถึงความสำเร็จของผู้วิจัย แต่ผู้วิจัยมีความภาคภูมิใจเป็นอย่างมากที่ประสบความสำเร็จได้ในวันนี้ คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอน้อมบูชาพระคุณบิดามารดา และบูรพาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนวิชาความรู้ให้ความเมตตาแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด และเป็นกำลังใจสำคัญที่ทำให้การศึกษาระดับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ประโยชน์และประสบการณ์ที่ได้รับจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยจะนำไปประยุกต์ใช้ในการดำเนินชีวิต และการทำงานโดยเต็มกำลังความรู้ ความสามารถ เพื่อให้ก่อประโยชน์สูงสุดทั้งต่อตนเอง สังคม และประเทศชาติต่อไป

พิพัฒน์ สุดยิ่ง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 น้ำชาข้าว.....	3
2.2 แบคทีเรียลเชลลูโลส.....	5
2.3 จุลินทรีย์ผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลส.....	9
2.4 การสังเคราะห์แบคทีเรียลเชลลูโลส.....	11
2.5 การผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลส.....	14
2.5.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ และการสังเคราะห์แบคทีเรียลเชลลูโลส.....	14
2.5.1.1 แหล่งคาร์บอน.....	14
2.5.1.2 แหล่งไนโตรเจน.....	15
2.5.1.3 พีเอช.....	15

2.5.1.4	อุณหภูมิ	16
2.5.2	วิธีผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูโลส	16
2.5.2.1	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจานหมุน (Rotating disk bioreactor).....	17
2.6.2.2	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นจานหมุนชีวภาพ (Rotating biological contactor bioreactor).....	17
2.6.2.3	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว (Airlift bioreactor).....	17
2.6	การประยุกต์แบคทีเรียลเซลล์ูโลส	19
2.6.1	การประยุกต์ด้านอาหาร	19
2.7.2	การประยุกต์ในการผลิตกระดาษ	19
2.7.3	การประยุกต์ในการทำไดอะแพรมแปลงความถี่เสียง.....	20
2.7.4	การประยุกต์ด้านเภสัชกรรม	20
บทที่ 3	อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	23
3.1	สารเคมี.....	23
3.2	เครื่องมือ.....	24
3.3	อุปกรณ์อื่น ๆ	25
3.4	วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	26
3.4.1	การเก็บตัวอย่างและการเตรียมน้ำข้าวข้าว.....	26
3.4.2	การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อ	26
3.4.3	การเตรียมกล้าเชื้อ.....	26
3.4.4	การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียลเซลล์ูโลส	27
3.4.5	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูโลส	27
3.4.5.1	การศึกษาชนิดของอาหารต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูโลส.....	27
3.4.5.2	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูโลสในอาหาร water from washing rice medium (WWR)	27

3.4.5.2.1	ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง.....	27
3.4.5.2.2	พีเอช	28
3.4.5.2.3	ความเข้มข้นกล้ำเชื้อเริ่มต้น	28
3.4.5.2.4	อุณหภูมิ.....	28
3.4.5.2.5	ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต	29
3.4.5.2.6	ความเข้มของผงวุ้น	29
3.4.5.3	การศึกษาวิธีผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหาร WWR และ YE ภายใต้สภาวะ การเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) และแบบเขย่า (agitate culture)..	30
3.4.6	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	30
3.4.7	การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลส.....	30
3.4.7.1	การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM).....	30
3.4.7.2	การวิเคราะห์ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปคโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FT-IR)	31
3.4.7.3	การวิเคราะห์ด้วยเอกซเรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray diffraction; XRD)	31
3.4.7.4	การวิเคราะห์ด้วยดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential Scanning Calorimetry; DSC).....	31
บทที่ 4	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	32
4.1	การศึกษาตัวอย่างน้ำซาวข้าว.....	32
4.2	การคัดแยกเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส	35
4.3	การจัดจำแนกจุลินทรีย์โดย 16s rDNA	39
4.4	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. nataicola</i>	40
4.4.1	การศึกษาชนิดของอาหารต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. nataicola</i>	40
4.4.2	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. nataicola</i> ใน อาหาร water from washing rice medium (WWR)	41

4.4.2.1	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง.....	41
4.4.2.2	พีเอช.....	42
4.4.2.3	ความเข้มข้นกล้ำเชื้อ	44
4.4.2.4	อุณหภูมิเพาะเลี้ยง.....	45
4.4.2.5	ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต	47
4.4.2.6	เข้มข้นของผงวุ้น.....	48
4.4.3	การศึกษาวิธีผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสโดย <i>K. nataicol</i> ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) และแบบเขย่า (agitate culture)	50
4.4.4	การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียลเชลลูโลส.....	57
4.4.4.1	การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM).....	57
4.4.4.2	การวิเคราะห์ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FT-IR).....	60
4.4.4.3	การวิเคราะห์ด้วยเอกซเรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray diffraction; XRD).....	62
4.4.4.4	การวิเคราะห์ด้วยดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential Scanning Calorimetry; DSC).....	64
บทที่ 5	สรุปผลการทดลอง.....	67
	รายการอ้างอิง.....	68
	ภาคผนวก.....	77
	ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	79
	ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานและการคำนวณ.....	85
	ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบการทดลอง.....	91
	ประวัติผู้เขียน.....	110

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การบริโภคข้าวโลก ปี 2554/55 – 2559/60 4

ตารางที่ 2 โครงสร้างของแบคทีเรียเซลลูโลสจากแบคทีเรียสกุลต่าง ๆ 8

ตารางที่ 3 แบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ 10

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบความแตกต่างของถึงปฏิกรณชีวภาพแต่ละชนิดสำหรับการผลิต
แบคทีเรียเซลลูโลส 18

ตารางที่ 5 การประยุกต์แบคทีเรียเซลลูโลส..... 21

ตารางที่ 6 การพัฒนาและดัดแปลงแบคทีเรียเซลลูโลสโดยการเพิ่มองค์ประกอบบางชนิด..... 22

ตารางที่ 7 แหล่งที่มาของน้ำข้าวข้าว 33

ตารางที่ 8 ชนิดผลไม้และแหล่งที่มาของผลไม้ที่นำมาคัดแยกเชื้อผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส 36

ตารางที่ 9 การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจาก *K. nataicol* โดยใช้น้ำข้าวข้าว เทียบกับเชื้อและแหล่ง
คาร์บอนต่าง ๆ..... 52

ตารางที่ 10 การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40, 50, 60, 70 ,80 ,90 และ
100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 83

ตารางที่ 11 การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.25, 0.30 ,0.35, 0.40 และ
0.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 83

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร..... 85

ตารางที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร..... 87

ตารางที่ 14 ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ของน้ำข้าวข้าวจากแหล่งที่มาต่าง ๆ 91

ตารางที่ 15 ความเข้มข้นน้ำตาลน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ของน้ำข้าวข้าวจากแหล่งที่มาต่าง ๆ
..... 92

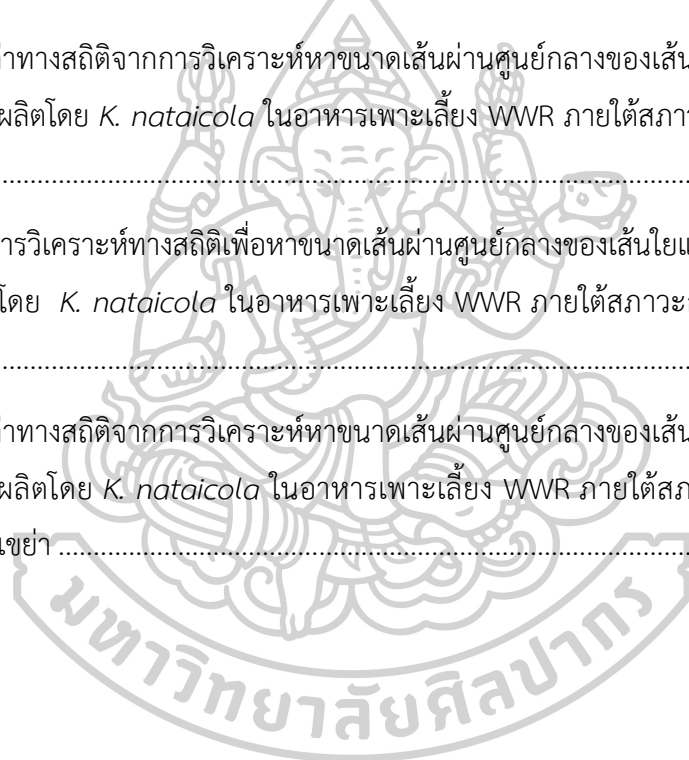
ตารางที่ 16 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม
สำหรับผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในอาหาร WWR 93

ตารางที่ 17 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม
สำหรับผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในอาหาร WWR 93

ตารางที่ 18 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับผลิต แบคทีเรียลเชลลูโลสในอาหาร WWR.....	93
ตารางที่ 19 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับผลิต แบคทีเรียลเชลลูโลสในอาหาร WWR.....	93
ตารางที่ 20 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาความเข้มข้นกล้ำเชื้อเริ่มต้นที่ เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสในอาหาร WWR	94
ตารางที่ 21 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาความเข้มข้นกล้ำเชื้อเริ่มต้นที่ เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสในอาหาร WWR	94
ตารางที่ 22 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาอุณหภูมิเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม สำหรับผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสในอาหาร WWR	94
ตารางที่ 23 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาอุณหภูมิเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม สำหรับผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสในอาหาร WWR	94
ตารางที่ 24 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาการผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสใน อาหาร WWR ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต.....	95
ตารางที่ 25 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสใน อาหาร WWR ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต.....	95
ตารางที่ 26 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาการผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสใน อาหาร WWR ที่มีการเติมผงวุ้น	95
ตารางที่ 27 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสใน อาหาร WWR ที่มีการเติมผงวุ้น	95
ตารางที่ 28 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่งและ แบบเขย่า สำหรับผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสในอาหาร WWR.....	96
ตารางที่ 29 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่งและ แบบเขย่า สำหรับผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสในอาหาร WWR.....	96
ตารางที่ 30 น้ำหนักแบคทีเรียลเชลลูโลสแห้งที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่าง ๆ ในอาหาร WWR โดย K. nataicola ภายใต้สภาวะการหมักแบบนิ่ง.....	97

ตารางที่ 31	น้ำหนักแบคทีเรียลเซลล์ูโลสแห่งที่พีเอชต่าง ๆ ในอาหาร WWR และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย <i>K. nataicola</i> ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	98
ตารางที่ 32	น้ำหนักแบคทีเรียลเซลล์ูโลสแห่งที่ความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้นต่าง ๆ ในอาหาร WWR พีเอช 4.5 และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย <i>K. Nataicola</i> ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	99
ตารางที่ 33	น้ำหนักแบคทีเรียลเซลล์ูโลสแห่งที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในอาหาร WWR พีเอช 4.5 ความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย <i>K. nataicola</i> ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	100
ตารางที่ 34	น้ำหนักแบคทีเรียลเซลล์ูโลสแห่งที่ความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนตต่าง ๆ ในอาหาร WWR พีเอช 4.5 ความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย <i>K. nataicola</i> ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	101
ตารางที่ 35	น้ำหนักแบคทีเรียลเซลล์ูโลสแห่งในอาหารต่างชนิดกันโดย <i>K. nataicola</i> ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	101
ตารางที่ 36	น้ำหนักแบคทีเรียลเซลล์ูโลสแห่งที่ความเข้มข้นผงวุ้นต่าง ๆ ในอาหาร WWR พีเอช 4.5 ความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย <i>K. nataicola</i> ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	102
ตารางที่ 37	น้ำหนักแบคทีเรียลเซลล์ูโลสแห่งในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE พีเอช 4.5 ความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย <i>K. nataicola</i> ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	103
ตารางที่ 38	น้ำหนักแบคทีเรียลเซลล์ูโลสแห่งในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE พีเอช 4.5 ความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย <i>K. nataicola</i> ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า	103
ตารางที่ 39	การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลล์ูโลสผลิตโดย <i>K. nataicola</i> ในอาหารเพาะเลี้ยง YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	104

ตารางที่ 40 การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลส ผลิตโดย <i>K. nataicola</i> ในอาหารเพาะเลี้ยง YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	105
ตารางที่ 41 ค่าทางสถิติจากการวิเคราะห์หาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลส ผลิตโดย <i>K. nataicola</i> ในอาหารเพาะเลี้ยง YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	105
ตารางที่ 42 การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลสผลิต โดย <i>K. nataicola</i> ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	106
ตารางที่ 43 ค่าทางสถิติจากการวิเคราะห์หาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลส ผลิตโดย <i>K. nataicola</i> ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	107
ตารางที่ 44 การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลสผลิต โดย <i>K. nataicola</i> ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า	108
ตารางที่ 45 ค่าทางสถิติจากการวิเคราะห์หาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลส ผลิตโดย <i>K. nataicola</i> ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ เขย่า	109

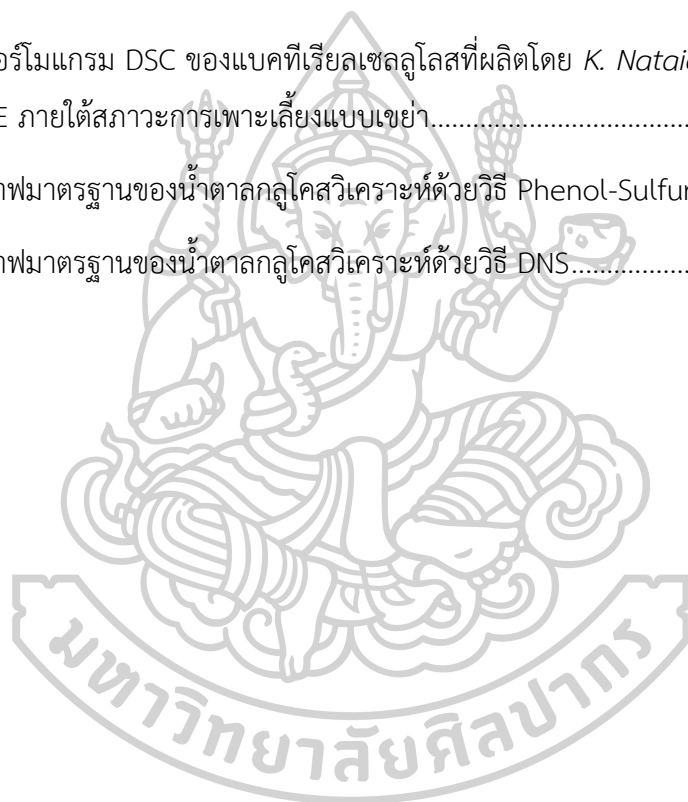


สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างโดยรวมของแบคทีเรียลเซลลูโลส.....	6
ภาพที่ 2 โครงสร้างของ Cellulose I และ Cellulose II.....	7
ภาพที่ 3 วิถีเมแทบอลิซึมของ <i>A. xylinum</i> ในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส.....	12
ภาพที่ 4 โครงสร้างของ cyclic diguanylic acid (c-di-GMP).....	13
ภาพที่ 5 โมเดลการควบคุมการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของ <i>A. xylinum</i>	13
ภาพที่ 6 ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) และความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ของน้ำซาวข้าวจากแหล่งที่มาต่าง ๆ	34
ภาพที่ 7 การคัดแยกเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากแอปเปิ้ล.....	38
ภาพที่ 8 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. Nataicola</i> ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	41
ภาพที่ 9 ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. Nataicola</i> ในอาหาร WWR ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	42
ภาพที่ 10 พีเอชต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. Nataicola</i> ในอาหาร WWR ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	43
ภาพที่ 11 ความเข้มข้นกลูต้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. Nataicola</i> ในอาหาร WWR พีเอชเท่ากับ 4.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	45
ภาพที่ 12 อุณหภูมิเพาะเลี้ยงต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. Nataicola</i> ในอาหาร WWR พีเอชเท่ากับ 4.5 ความเข้มข้นกลูต้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรเป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	46

ภาพที่ 13 ความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. Nataicola</i> ในอาหาร WWR พีเอชเท่ากับ 4.5 กล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง.....	48
ภาพที่ 14 ความเข้มข้นผงวุ้นต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหาร WWR พีเอชเท่ากับ 4.5 กล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง.....	49
ภาพที่ 15 การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. nataicol</i> ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และแบบเขย่าในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE พีเอชเท่ากับ 4.5 ความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน	51
ภาพที่ 16 แบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหาร WWR ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง.....	53
ภาพที่ 17 แบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหาร YE ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง.....	54
ภาพที่ 18 แบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหาร WWR ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบเขย่า.....	55
ภาพที่ 19 แบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหาร YE ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบเขย่า.....	56
ภาพที่ 20 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหาร WWR ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง.....	58
ภาพที่ 21 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหาร YE ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง.....	58
ภาพที่ 22 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหาร WWR ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า.....	59
ภาพที่ 23 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหาร YE ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า.....	59
ภาพที่ 24 อินฟารเรดสเปกตรัมของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i>	61

ภาพที่ 25	ดิฟแฟรกโตแกรม XRD ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i>	63
ภาพที่ 26	เทอร์โมแกรม DSC ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	65
ภาพที่ 27	เทอร์โมแกรม DSC ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหารเพาะเลี้ยง YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	65
ภาพที่ 28	เทอร์โมแกรม DSC ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า	66
ภาพที่ 29	เทอร์โมแกรม DSC ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหารเพาะเลี้ยง YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า	66
ภาพที่ 30	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสวิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric	86
ภาพที่ 31	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS	88



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

แบคทีเรียลเซลลูโลส (Bacterial cellulose) เป็นเส้นใยนาโนพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 50 นาโนเมตร ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคส ประมาณ 2,000-18,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า (1-4) ไกลโคซิดิก โดยเกิดจากการสังเคราะห์ของแบคทีเรียบางชนิด เซลลูโลส (cellulose) ที่มาจากแบคทีเรียมีคุณสมบัติแตกต่างจากเซลลูโลสที่ได้จากพืชและผลไม้ เช่น มีขนาดเส้นใยเล็กกว่าเส้นใยจากพืชชั้นสูงประมาณ 10-1,000 เท่า และมีขนาดเส้นใยเล็กกว่าเส้นใยสังเคราะห์ประมาณ 100 เท่า มีความบริสุทธิ์สูง ไม่มีการเจือปนของเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) และเพกทิน (pectin) เหมือนเซลลูโลสที่ได้จากพืชและผลไม้ และมีความเป็นผลึกสูง (Chawla *et al.*, 2009; Klemm *et al.*, 2006) โดยกระบวนการสกัดเซลลูโลสทั้งจากพืชและผลไม้ ต้องใช้กรรมวิธีทางเคมีในการกำจัดสารลิกนิน และการฟอกสีเซลลูโลสซึ่งจำเป็นต้องใช้สารเคมี และพลังงานจำนวนมาก ทำให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก ประกอบกับในปัจจุบันจำนวนป่าไม้ลดลงอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดปัญหาขาดแคลนแหล่งวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลสที่มาจากพืช และเมื่อมีการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม พบว่าเกิดปัญหาหลายด้าน เช่น ราคาของวัตถุดิบที่ไม่แน่นอน ขึ้นกับสภาวะของตลาด รวมทั้งบางครั้งคุณภาพของวัตถุดิบไม่เป็นไปตามที่ต้องการ ซึ่งการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสแบบดั้งเดิมจะใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) เช่น กลูโคส (glucose) ฟรุคโตส (fructose) และซูโครส (sucrose) (Bae and Shoda, 2005) โดยแหล่งคาร์บอนเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดต้นทุนของกระบวนการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสสูงถึง 65 เปอร์เซ็นต์ (Jedrzejczak-Krzepkowska *et al.*, 2016) ปัจจุบันจึงมีความพยายามเป็นอย่างยิ่งในการหาแหล่งคาร์บอนราคาถูกเพื่อผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส เช่น น้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษ (Uraki *et al.*, 2002) น้ำเสียจากอุตสาหกรรมการแปรรูปพุทราหวาน (Li *et al.*, 2015) และน้ำเสียหลักจากการหมักไขมัน (Huang *et al.*, 2016) เป็นต้น เนื่องด้วยคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical) ของแบคทีเรียลเซลลูโลสดังที่กล่าวไว้ข้างต้น จึงทำให้แบคทีเรียลเซลลูโลสมีความน่าสนใจเพื่อเป็นวัสดุทางเลือกใหม่ สำหรับทดแทนพลาสติกในบางอุตสาหกรรม และนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด เช่น ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกและกระดูกอ่อน (Svensson *et al.*, 2005) การซ่อมแซมเนื้อเยื่อ (Christner *et al.*, 1999; Mello *et al.*, 1997; Suehiro *et al.*, 2007) เส้นเลือดเทียม (Klemm *et al.*, 2001) และจอภาพอิเล็กทรอนิกส์ (Shah and Brown, 2005) เป็นต้น

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส พร้อมทั้งการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อม โดยนำน้ำข้าวข้าว (water from washing rice) มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อลดต้นทุนในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส อีกทั้งยังใช้ความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพมาในกระบวนการผลิต และยังช่วยลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 คัดแยกเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากผลไม้

1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากเชื้อที่คัดเลือกได้ โดยใช้ น้ำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

1.2.3 ประเมินคุณลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 คัดแยกเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากผลไม้

1.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากเชื้อที่คัดเลือกได้ โดยใช้ น้ำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ สูตรอาหารที่เหมาะสม ระยะเวลาเพาะเลี้ยง สัดส่วนของกล้าเชื้อเริ่มต้น พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเริ่มต้น อุณหภูมิเพาะเลี้ยง การเติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) และการเติมผงวุ้นในอาหารเพาะเลี้ยง

1.3.3 ศึกษาวิธีการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส ได้แก่ การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในสภาวะแบบนิ่ง (static culture) การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในสภาวะแบบเขย่า (agitate culture)

1.3.4 ประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้ ได้แก่ สัณฐานวิทยา โครงสร้างทางเคมี ความเป็นผลึก และความบริสุทธิ์ของแบคทีเรียลเซลลูโลสด้วยเทคนิค SEM, FT-IR, XRD และ DSC

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากเชื้อที่คัดแยกได้ โดยใช้ น้ำข้าวข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกแทนน้ำตาล สามารถนำแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพที่ประยุกต์กับงานในด้านต่าง ๆ อีกทั้งยังช่วยลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่งด้วย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำข้าวข้าว

ข้าว ถือเป็นพืชอาหารที่ประชากรกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลกบริโภคเป็นอาหารหลัก ดังแสดงในตารางที่ 1 และมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรที่มีความต้องการในการบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก อาศัยอยู่ในแถบทวีปเอเชีย โดยเฉพาะประเทศไทยนิยมบริโภคข้าวมากกว่าประเทศอื่น ๆ ในโลก โดยประชากรของโลกบริโภคข้าวเฉลี่ย 118 กิโลกรัมต่อคนต่อปี ส่วนคนไทยบริโภคข้าวเฉลี่ย 335 กิโลกรัมต่อคนต่อปี (Mungmuang and Waraeaksiri, 2017) จึงถือได้ว่าข้าวมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์นับแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน นอกจากนี้ ปัจจุบันมีโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปข้าวเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก เช่น ผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องสำเร็จรูป ได้แก่ โจ๊กกล้องสำเร็จรูป หรืออาหารจานเดียวประเภทข้าวแช่แข็งในรูปแบบต่าง ๆ ผลิตภัณฑ์ขนมขบเคี้ยวและอาหารแช่ ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมัก ได้แก่ ข้าวหมาก ขนมจีน และผลิตภัณฑ์ประเภทสุรา เส้นก๋วยเตี๋ยวและเส้นหมี่ ขนมหวานและขนมไทย แป้งข้าว สตาร์ชข้าว และสตาร์ชข้าวตัดแปร ซึ่งก่อนการนำข้าวไปบริโภคและนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในแต่ละครั้งจำเป็นต้องมีกระบวนการล้างเมล็ดข้าว เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่กับข้าวออก ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า การซาวข้าว และน้ำที่ได้จากการซาวข้าวเรียกว่า น้ำซาวข้าว ปกติจะล้างข้าวไม่เกิน 1-2 ครั้ง เพราะจะทำให้สูญเสียวิตามินที่มีอยู่ในเมล็ดข้าวอย่าง เช่น วิตามินบี ซึ่งละลายได้ในน้ำ น้ำซาวข้าวเป็นสิ่งที่มีประโยชน์ เนื่องจากในน้ำซาวข้าวประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ เช่น กรดเพอรูลิกช่วยต่อต้านสารอนุมูลอิสระ, อัลโทอินช่วยลดการระคายเคืองและอาการแพ้ต่าง ๆ ของผิว, ไนอาซินช่วยทำลายพิษหรือที่ออกซินจากมลพิษ แอลกอฮอล์ และยาเสพติด, ไบโอฟลวิน ช่วยป้องกันไขมันอุดตันในเส้นเลือด และอินซิทอลช่วยให้ผมน้ำหนักยึดหยุ่นไม่ขาดหาย และลดการแตกปลายของเส้นผม (Jaiyen, 2013) ด้วยคุณประโยชน์ของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในน้ำซาวข้าว ส่งผลให้ในปัจจุบันเริ่มมีการนำน้ำซาวข้าวมาใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ในด้านต่าง ๆ แทนการทิ้งโดยไม่เกิดประโยชน์

ตารางที่ 1 การบริโภคข้าวโลก ปี 2554/55 – 2559/60

ประเทศ	ปี 2554/55	ปี 2555/56	ปี 2556/57	ปี 2557/58	ปี 2558/59	ปี 2559/60
บังคลาเทศ	34.300	34.500	34.900	35.100	35.100	35.000
บราซิล	7.928	7.850	7.900	7.925	7.800	7.900
เมียนมาร์	10.200	10.400	10.450	10.500	10.700	10.900
กัมพูชา	3.400	3.550	3.650	3.615	3.700	3.725
จีน	139.600	141.000	143.000	144.500	144.000	144.000
อียิปต์	3.620	4.050	4.000	4.000	3.900	4.000
อินเดีย	93.334	94.972	98.727	98.244	93.512	97.000
อินโดนีเซีย	38.188	38.127	38.500	38.300	37.900	37.700
ญี่ปุ่น	8.376	8.351	8.380	8.600	8.500	8.500
เกาหลีใต้	4.880	4.489	4.422	4.197	4.374	4.484
เนปาล	3.677	3.535	3.811	3.716	3.500	3.650
ไนจีเรีย	5.600	5.300	5.500	5.400	5.200	5.000
ฟิลิปปินส์	12.860	12.850	12.850	13.200	13.200	13.300
เวียดนาม	19.650	21.600	22.000	22.000	22.000	22.200
สหรัฐอเมริกา	3.492	3.779	3.977	4.301	3.529	4.220
ไทย	10.400	10.600	10.600	10.500	9.800	10.600
อื่น ๆ	61.320	60.685	65.651	64.024	63.651	66.202
รวม	460.825	465.638	478.318	478.122	470.366	478.381

หน่วย: ล้านตันข้าวสาร

ที่มา Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), (2016)

2.2 แบคทีเรียเซลลูโลส

แบคทีเรียเซลลูโลสเป็นสารชีวโมเลกุลประเภทคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลิเมอร์เชิงเส้น มีลักษณะเป็นโพลิเมอร์ที่ไม่มีกิ่งก้าน (unbranched) ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา (1 → 4) ไกลโคซิดิก ผลิตได้จากแบคทีเรียบางสายพันธุ์ (Bodin *et al.*, 2011) มีระดับการเกิดพอลิเมอร์ (Degree of polymerization; DP) (Zhou *et al.*, 2007) อยู่ในช่วงระหว่าง 2000-6000 (Jonas and Farah, 1998) แต่ในบางครั้งอาจพบอยู่ในช่วงระหว่าง 16,000-20,000 (Watanabe *et al.*, 1998) โมเลกุลของเซลลูโลสอยู่ในลักษณะเป็นเส้นยาวเรียงขนานกันเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน และรวมกันอยู่เป็นมัด มีลักษณะเป็นเส้นใยเล็ก ๆ เรียกว่าไฟบริล (fibril) (Ul-Islam *et al.*, 2012) โดยทั่วไปจะไม่พบเซลลูโลสที่เรียงตัวเป็นเส้นเดี่ยว แต่พบเซลลูโลสลักษณะเป็นกลุ่มเรียงตัวขนาน และเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของโมเลกุลหนึ่งกับออกซิเจนอะตอมที่อยู่ในวงแหวนของโมเลกุลอื่นอย่างมีระเบียบ เรียกว่าผลึกไมเซล (crystalline micelle) แต่ละไมเซลประกอบด้วยโมเลกุลของเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุล มีลักษณะรูปร่างเป็นริบบินหนาในรูปไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งไมโครไฟบริลมีลักษณะเป็นพาราเจล (paragel) หมุนไปทางซ้าย เกิดจากการเรียงตัวของไมเซลประมาณ 10-20 ไมเซล หรือทับกันเป็นเกลียวรอบแกนของเส้นใย โดยมีพันธะไฮโดรเจน 2 ตำแหน่ง ในแต่ละเส้นสายของเซลลูโลส คือ ระหว่างออกซิเจนตำแหน่งที่ 6 ของน้ำตาลกลูโคส กับหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 2 ของน้ำตาลกลูโคสโมเลกุลใกล้กัน และระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนในวงแหวนอื่น แสดงดังภาพที่ 1

จากการวิเคราะห์เซลลูโลสโดยใช้การหักเหรังสีเอกซ์ (X-ray) พบว่า มีผลึก 2 รูปแบบ คือ cellulose I (ribbon-like polymer) และ cellulose II (thermodynamically stable polymer) (Chawla *et al.*, 2009) แสดงดังภาพที่ 2 แบคทีเรียเซลลูโลสมีโครงสร้างแบบ cellulose I เป็นองค์ประกอบหลักประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากโครงสร้างของพืชชั้นสูงที่เป็นแบบ cellulose II ซึ่งจะมีความแข็งแรงกว่า cellulose I

องค์ประกอบทางเคมีของแบคทีเรียเซลลูโลสประกอบด้วย ไนโตรเจน น้ำ สารเยื่อใย โปรตีน เถ้า และคาร์โบไฮเดรต 0.06, 94.6, 1.15, 0.84, 0.10 และ 3.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Guzman *et al.*, 1982) นอกจากนี้ ยังพบแร่ธาตุ ๆ ประกอบด้วยแคลเซียม ฟอสฟอรัส และไนอาซีน 0.520 0.570 และ 0.022 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียเซลลูโลสสามารถละลายได้ในสารละลายกรดซัลฟิวริก และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยกรดไปสลายพันธะไฮโดรเจนของแบคทีเรียเซลลูโลส แต่จะไม่ละลายในน้ำเดือด ในสารละลายที่เป็นต่าง แอลกอฮอล์ และอะซิโตน

ลักษณะโครงสร้างของแบคทีเรียเซลลูโลส

ระดับโมโนเมอร์
(Monomer unit level)

โมเลกุลของกลูโคส

ระดับสายพอลิเมอร์
(Polymer chain level)

พันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมต่อกันระหว่างเซลลูโลสแต่ละเส้น

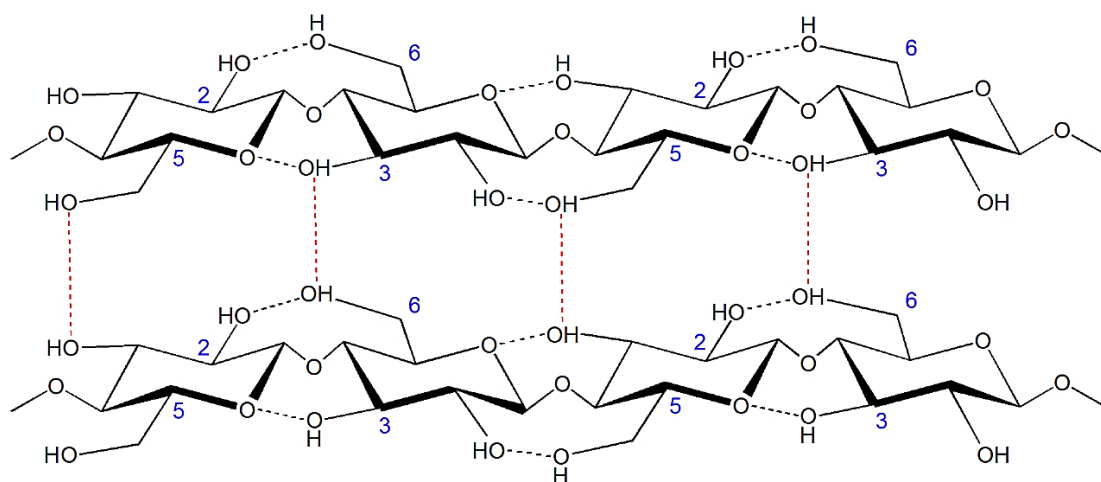
ระดับโครงสร้างของเส้นใย 3 มิติ
(Level of three dimensional network structure)

การจัดเรียงของนาโนไฟบริล (nanofibril)

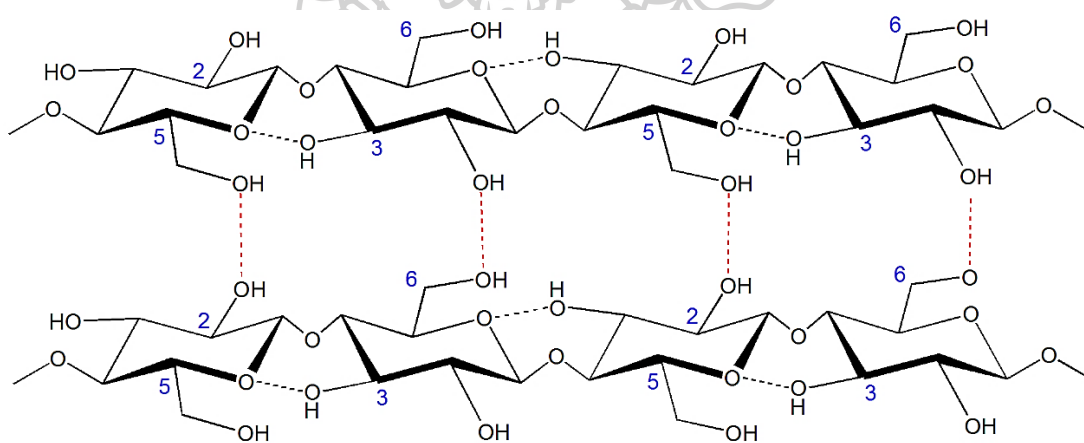
โครงสร้าง 3 มิติ

บนแบคทีเรียเซลลูโลส

ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างโดยรวมของแบคทีเรียเซลลูโลส
ที่มา ดัดแปลงมาจาก Sulaeva et al. (2015)



Cellulose I



Cellulose II

ภาพที่ 2 โครงสร้างของ Cellulose I และ Cellulose II

ที่มา ดัดแปลงมาจาก Credou and Berthelot (2014)

แบคทีเรียเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่มีความบริสุทธิ์ ปราศจากกลีโคลิน และเฮมิเซลลูโลส มีความเป็นผลึกสูง มีระดับความเป็นพอลิเมอร์สูง มีโครงสร้างระดับนาโน มีความต้านทานแรงดึงสูงกว่าเส้นใยสังเคราะห์ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการอุ้มน้ำ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพย่อยสลายทางชีวภาพได้ดี และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Cai and Kim, 2010) โครงสร้างทางพอลิเมอร์ของแบคทีเรียเซลลูโลสเชื่อมต่อกันอย่างแข็งแรงด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลเรียกว่าไมโครไฟบริล ซึ่งประกอบด้วยสายกลูแคนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนเพื่อให้เกิดเป็นผลึก โดยโครงสร้างของแบคทีเรียเซลลูโลสแตกต่างกัน ขึ้นกับการสังเคราะห์และกลไก การควบคุมของแบคทีเรียแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2 (Jonas and Farah, 1998) และขนาดเส้นใยไมโครไฟบริลของแบคทีเรียเซลลูโลสจะมีขนาดเล็ก มีความกว้าง 100 นาโนเมตร และความหนาประมาณ 3-8 นาโนเมตร ซึ่งขนาดเล็กกว่าเส้นใยของพืชชั้นสูง และเส้นใยสังเคราะห์ประมาณ 100-1,000 เท่า และ 100 เท่า ตามลำดับ (Yoshinaga *et al.*, 1997)

ตารางที่ 2 โครงสร้างของแบคทีเรียเซลลูโลสจากแบคทีเรียสกุลต่าง ๆ

สกุล (Genus)	โครงสร้างแบคทีเรียเซลลูโลส
<i>Acetobacter</i>	เป็นแผ่นที่เกิดจากเส้นใย
<i>Achromobacter</i>	เส้นใย
<i>Aerobacter</i>	เส้นใย
<i>Agrobacterium</i>	เส้นใยสั้น ๆ
<i>Alcaligenes</i>	เส้นใย
<i>Pseudomonas</i>	เป็นเส้นใยไม่ชัดเจน
<i>Rhizobium</i>	เส้นใยสั้น ๆ
<i>Sarcina</i>	ไม่มีรูปร่างแน่นอน
<i>Zoogloea</i>	ไม่ทราบแน่ชัด

ที่มา ดัดแปลงมาจาก Jonas and Farah (1998)

2.3 จุลินทรีย์ผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส

Hibbert and Barsha (1931) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติทางโครงสร้างของแบคทีเรียเซลลูโลส พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางโครงสร้างเหมือนกับเซลลูโลสที่มาจากพืช แม้ว่าจะสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และสาหร่าย โดยเชื้อราพบอยู่ในผนังเซลล์ชั้นใน เชื่อมกันด้วยพันธะ β -1,3 หรือ β -1,6 D-glucan คิดเป็นประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักผนังเซลล์แห้ง (Isizawa and Araragi, 1976) สาหร่ายพบในสาหร่ายสีเขียวซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) และไซแลน (xylan) ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ และในสาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta) พบในปริมาณน้อย ส่วนใหญ่พบในสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) และสาหร่ายสีทอง (Chrysophyta (Chrysophytes)) ส่วนแบคทีเรียพบทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Dickeya* และ *Rhodobacter* (Brown, 2004; Deinema and Zevenhuizen, 1917; Jahn *et al.*, 2011; Morgan *et al.*, 2013) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสสูงสุดคือ *Gluconoacetobacter xylinus* และ *Gluconoacetobacter hansenii* (Dourado *et al.*, 2016)

Acetobacter xylinus (*A. xylinum*) เป็นแบคทีเรียในวงศ์ *Acetobacteraceae* ประกอบด้วย 6 สกุล คือ *Acetobacter*, *Acidomona*, *Asaia*, *Gluconacetobacter* หรือ *Komagataeibacter*, *Gluconobacter* และ *Kozakia* ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) เซลล์มีลักษณะรูปร่างรีจนถึงเป็นท่อนตรงหรือโค้ง ขนาดของเซลล์กว้างประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน ยาวประมาณ 1.0-4.0 ไมครอน เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลารอบเซลล์ หรือที่ขั้วเซลล์ โคโลนีของ *Acetobacter* sp. มีสีชมพู เนื่องจากมีการสังเคราะห์สารพอร์ไฟรินส์ ไม่สร้างสปอร์ (non spore forming bacteria) เจริญได้ในที่มีอากาศ (aerobic bacteria) สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติก ออกซิไดซ์กรดอินทรีย์ประเภทอะซิเตท และแลคเตทเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non pathogen) *A. Xylinum* เป็นแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการศึกษากระบวนการสังเคราะห์ขั้นพื้นฐาน และนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์สำหรับการผลิตเซลลูโลส เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสสูงประมาณ 10-40 กรัมต่อลิตร (Okiyama *et al.*, 1992) และสามารถเจริญได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ

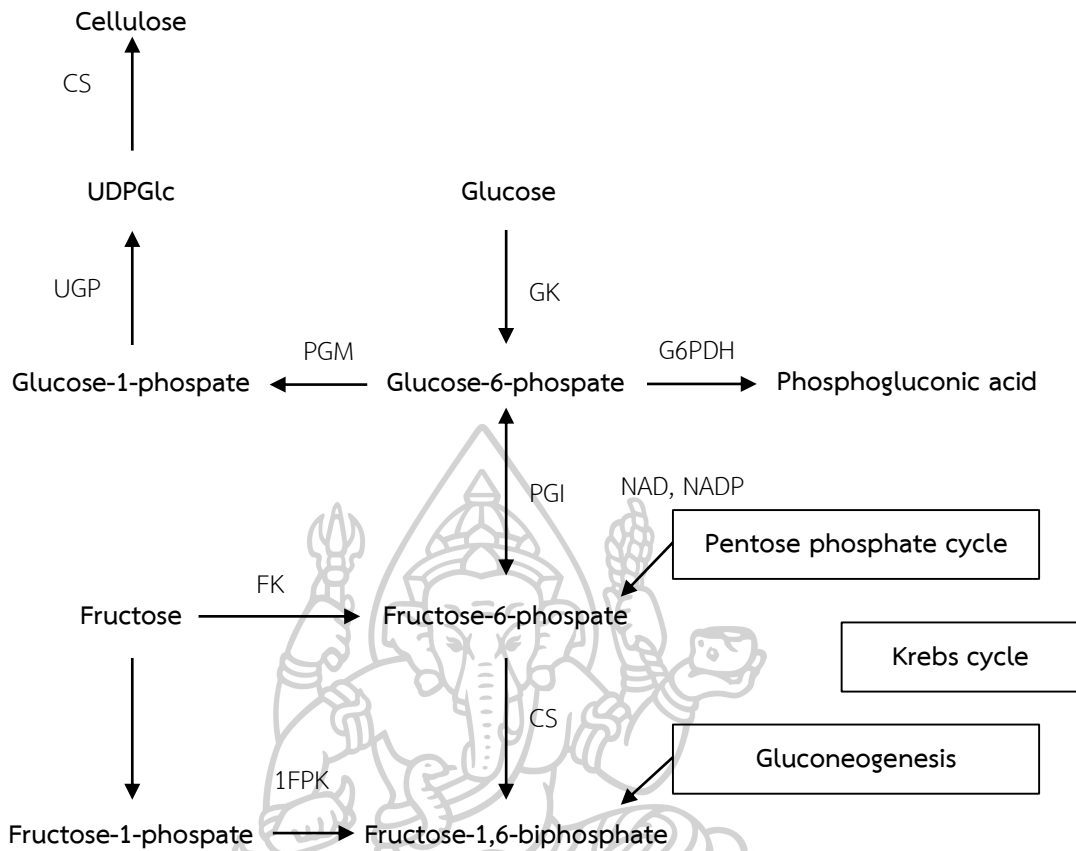
จุลินทรีย์	แหล่ง คาร์บอน	องค์ประกอบ		ระยะเวลา เพาะเลี้ยง	ผลได้ (กรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
		เพิ่มเติม				
<i>Acetobacter aceti</i> AJ 12368	ซูโครส	ไม่มี		6 วัน	1.07	Okiyama et al. (1992)
<i>Acetobacter</i> sp. A9	กลูโคส	เอทานอล		8 วัน	15.20	Son et al. (2001)
<i>Acetobacter</i> sp. V6	กลูโคส	เอทานอล		8 วัน	4.16	Son et al. (2003)
<i>Acetobacter xylinum</i> BPR2001	กากน้ำตาล	ไม่มี		3 วัน	7.82	Bae et al. (2004)
<i>Acetobacter xylinum</i> BRC 5	กลูโคส	เอทานอลและออกซิเจน		50 ชั่วโมง	15.30	Hwang et al. (1999)
<i>Acetobacter xylinum</i> E25	กลูโคส	ไม่มี		7 วัน	3.50	Krystynowicz et al. (2002)
<i>Acetobacter xylinum</i> NUST4.1	กลูโคส	โพรเตียมอัลจิเนต		5 วัน	6.00	Zhou et al. (2007)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23769	ไบโอดีเซล	ไม่มี		3 วัน	0.18	Sunagawa et al. (2012)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> IFO 13773	กลูโคส	ลิกโนซิลโฟเนท		7 วัน	10.10	Keshk and Sameshima (2006)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> strain (K3)	แมนนิทอล	ซาเซียว		7 วัน	3.34	Nguyen et al. (2008)
<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	กลีเซอรอลดิบ	ไม่มี		14 วัน	0.10	Carreira et al. (2011)
<i>Gluconacetobacter</i> sp. RKY5	กลีเซอรอล	ไม่มี		6 วัน	5.63	Kim et al. (2003)

2.4 การสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส

การสังเคราะห์เซลลูโลสจากสารตั้งต้นมีกระบวนการผลิตที่ซับซ้อนหลายขั้นตอน ที่มีความเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเอนไซม์และโปรตีนควบคุมจำนวนมาก แบคทีเรียลเซลลูโลสจัดเป็น primary metabolic product กลไกการสังเคราะห์เซลลูโลสของ *A. xylinum* จำเป็นต้องใช้ ออกซิเจน และแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์ (polymerization) โดยมี UDP-Glucose (uridine diphosphoglucose) เป็นสารตั้งต้น (precursor substance) (Peter Ross *et al.*, 1991) ดังปฏิกิริยา

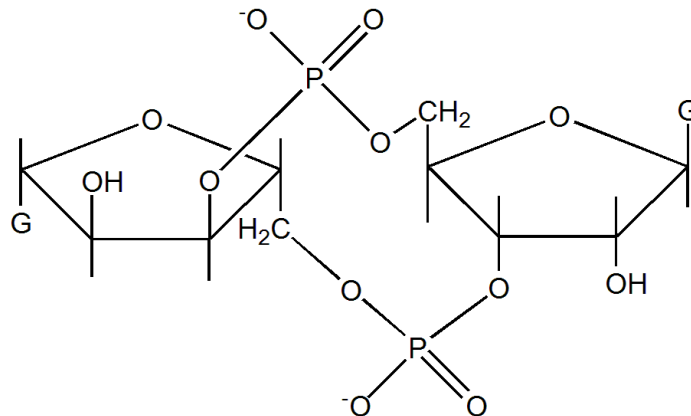


กลไกการสังเคราะห์เซลลูโลสของ *A. xylinum* จัดเป็นกระบวนการเมแทบอลิซึมขั้นสุดท้ายของการใช้ประโยชน์จากคาร์บอน โดยเกี่ยวข้องกับ pentose phosphate cycle หรือ krebs cycle ควบคู่ไปกับกระบวนการสร้างกลูโคสแบบใหม่ (gluconeogenesis) ซึ่งการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของ *A. xylinum* สามารถเปลี่ยนสารประกอบที่เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ hexose, glycerol, dihydroxy acetone, pyruvate และ dicarboxylic acid ไปเป็นเซลลูโลส โดยสารประกอบต่าง ๆ จะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) ในช่วงของ oxaloacetate decarboxylation ไปเป็น pyruvate คือเปลี่ยน hexoses ในกระบวนการสร้างกลูโคสแบบใหม่ (gluconeogenesis) เช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอนตัวอื่น และ *A. xylinum* จัดเป็นแบคทีเรียกรดแอซิติก (acetic acid bacteria) จึงไม่มีกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์ phosphofructose kinase ได้ (Chawla *et al.*, 2009; Peter Ross *et al.*, 1991) กลไกการสังเคราะห์เซลลูโลสของ *A. xylinum* ภาพที่ 3 โดยเริ่มจากน้ำตาลกลูโคสถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ glucose phosphorylation ซึ่งกลูโคสถูกเปลี่ยนไปเป็น glucose-6-phosphate (Glc-6-P) โดยกลูโคไคเนส (glucokinase) จากนั้น glucose-6-phosphate ถูกไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) ด้วยฟอสโฟกลูโคมิวเตส (phosphor-glucomutase) เปลี่ยนไปเป็น glucose-1-phosphate และถูกเปลี่ยนไปเป็น Uridine 5'-diphosphoglucose (UDPGlc) โดย UDPGlc pyrophosphorylase ในขั้นตอนสุดท้าย UDPGlc ถูกสังเคราะห์เป็นแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเซลลูโลสซินเทส (cellulose synthase) (Chawla *et al.*, 2009) โดยมี cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) เป็นตัวกระตุ้น (activator) แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 3 วิถีเมแทบอลิซึมของ *A. xylinum* ในการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลส
ที่มา ดัดแปลงมาจาก Chawla *et al.* (2009)

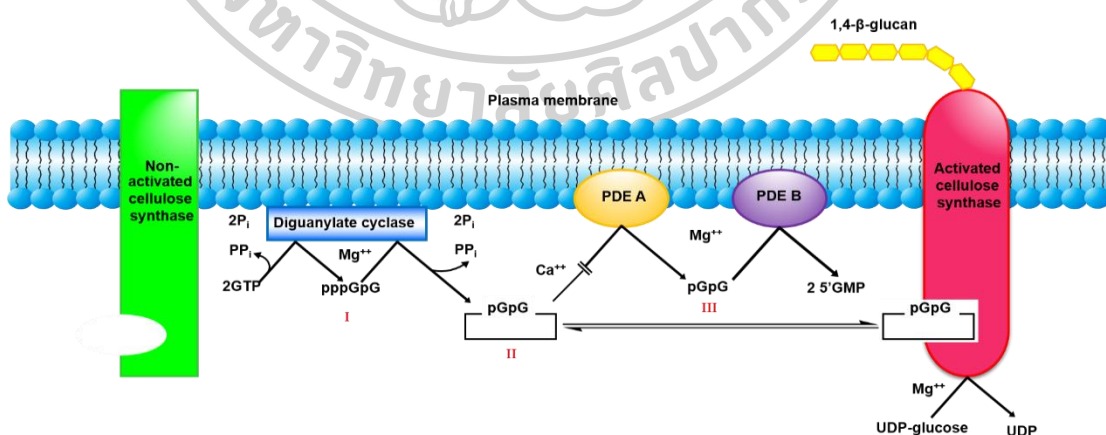
CS คือ cellulose synthase, FBP คือ fructose-1, 6-bisphosphate phosphatase, FK คือ glucokinase, GK คือ glucokinase, G6PDH คือ glucose -6-phosphatedehydrogenase, NAD คือ nicotinamide adenine dinucleotide, NADP คือ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate 1 PFK คือ fructose-1-phosphatekinase, PGI คือ phospho glucoisomerase, PGM คือ phosphoglucomutase, UGP คือ pyrophosphorylase และ UDPGlc คือ uridine diphosphoglucose



ภาพที่ 4 โครงสร้างของ cyclic diguanylic acid (c-di-GMP)

ที่มา ดัดแปลงมาจาก Peter Ross *et al.* (1991)

เซลลูโลสซินเทส หรือ 1,4-β-D-glucan 4-β-D-glucosyltransferase; (EC 2.4.1.12) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสโดยกระบวนการเกิดพอลิเมอร์ เซลลูโลสซินเทสที่สังเคราะห์ขึ้นโดย *A. xylinum* มีลักษณะเป็น membrane-bound มีความจำเพาะต่อ UDP-glucose ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ β-glucan chain และ UDP (uridine diphosphoglucose) โดยมี c-di-GMP เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งสังเคราะห์จาก GTP (guanosine triphosphate) โดยมีไดกัวโนเลตไซเคเลส (diguanylate cyclase) เป็นตัวเร่ง หรือสังเคราะห์โดยการย่อยสลาย GTP โดยมีฟอสโฟไดเอสเทอเรส เอ และ บี (phosphodiesterases A, B) เป็นตัวเร่ง แสดงดังภาพที่ 5 (Peter Ross *et al.*, 1991)



ภาพที่ 5 โมเดลการควบคุมการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของ *A. xylinum*

ที่มา ดัดแปลงมาจาก Peter Ross *et al.* (1991)

GMP คือ guanosine monophosphate GTP คือ guanosine triphosphate, และ PDE คือ phosphodiesterase

2.5 การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส

2.5.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ และการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลส

อาหาร สภาวะสิ่งแวดล้อม และผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by-product) ที่เกิดขึ้น ล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส โดยทั่วไปอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนสูง แต่มีแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงถึง 60-80 เปอร์เซ็นต์ ของแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ในกระบวนการหมัก เพราะฉะนั้น การศึกษาสภาวะของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จึงเป็นปัจจัยสำคัญเพื่อเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสที่สูงขึ้น สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อ ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ โพแทสเซียม และเกลือแมกนีเซียม (Chawla *et al.*, 2009) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ตลอดจนการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสมีดังต่อไปนี้

2.5.1.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ (Stanbury and Whitaker, 1984) ซึ่งในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดยทั่วไปใช้กลูโคส หรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต แต่ยังคงมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องเพื่อหาแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ เช่น ฟรุคโตส มอลโตส ไซโลส แป้ง และกลีเซอรอล (Masaoka *et al.*, 1993)

Masaoka *et al.* (1993) ศึกษาการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 6, 12, 24 และ 48 กรัมต่อลิตร พบว่า มีการนำกลูโคสไปใช้เท่ากับ 100, 100, 68 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น ตามลำดับ นอกจากนี้ หากความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสไม่เหมาะสม จะส่งผลให้แบคทีเรียมีการผลิตกรดกลูโคนิก ซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส ทำให้ค่าพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงลดลง และการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสลดลงด้วย จึงเห็นได้ว่าผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นมีความสำคัญต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส (Chawla *et al.*, 2009)

Ishihara *et al.* (2002) ศึกษาการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจาก *A. xylinum* IFO 15606 โดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า มีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร Ramana *et al.* (2000) ศึกษาการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจาก *A. xylinum* NCIM 2526 พบว่าซูโครส กลูโคส และแมนนิทอล เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต ต่อมา Nguyen *et al.* (2008) ศึกษาการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจาก *G. xylinus* พบว่า แมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงที่สุด

Bae and Shoda (2005) ศึกษาการผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลสจาก *A. xylinum* BPR2001 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า กากน้ำตาลที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกและความร้อนสามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงถึง 76 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่า กากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และยังส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า

2.5.1.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีน และในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งในเซลล์ของแบคทีเรียมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันไป แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีสารไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) แต่บางสายพันธุ์ต้องการสารไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen) แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เป็นสารประเภทแก๊ส แอมโมเนียม เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท สำหรับแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อแอมโมเนียม (NH_4^+) ถูกใช้ไปทำให้ค่าพีเอชของอาหารเกิดสภาวะเป็นกรด เนื่องจากเกิดการสะสมอนุมูลซัลเฟต (SO_4^{-2}) ส่วนแก๊สแอมโมเนียมและไนเตรทเมื่อถูกเมแทบอลิซึมทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Stanbury and Whitaker, 1984) Ramana *et al.* (2000) รายงานว่าการผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลสจาก *A. xylinum* โดยใช้เคซีนไฮโดรไลเซตและเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ผลได้เท่ากับ 5 และ 4.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.5.1.3 พีเอช

พีเอชของอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญของเซลล์และการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมัก (Ohara *et al.*, 1992) และยังผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารอาหาร (Andreyeva and Biryukov, 1973) รวมถึงการยอมให้สารอาหารผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ได้ Masaoka *et al.* (1993) รายงานว่าพีเอชของอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสอยู่ในช่วง 4.0-6.0 แต่หากพีเอชของอาหารลดลงต่ำกว่า 4 ส่งผลให้การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสลดลง ทั้งนี้ระหว่างกระบวนการหมักพบว่า จุลินทรีย์มีการผลิตกรดกลูโคนิก กรดแอสซิติค และกรดแลคติก ส่งผลให้พีเอชของน้ำหมักลดลง (Kongruang, 2008)

Alaban (1962) รายงานว่า พีเอชของอาหารในการเพาะเลี้ยง *A. Xylinum* เท่ากับ 4.0-5.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 3.0 การเจริญของเชื้อจะลดลง และที่ค่าพีเอชมากกว่า 8.0 เชื้อจะไม่สามารถเจริญได้ ส่วนการเติมกรดแอสซิติคในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1-10 เปอร์เซ็นต์ นอกจากเป็นการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ได้ เมื่อเติมกรดแอสซิติค 1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มปริมาณกรดเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนจาก *Penicillium* sp. และ *Bacillus* sp. ได้

Kongruang (2008) รายงานว่า การหมักในสภาวะนิ่ง โดยใช้ *G. xylinus* ทำให้พีเอชของอาหารลดลง เนื่องมาจากกระบวนการหายใจของเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการออกซิเดชัน เอทานอลไปเป็นกรดแอซีติก และการเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิก ส่วนการหมักแบบกึ่งกะ Shezad *et al.* (2010) และ Jagannath *et al.* (2008) รายงานว่า พีเอชของอาหารคงที่ เนื่องจากมีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะ ๆ

2.5.1.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อทั้งการเจริญเจริญของแบคทีเรีย และการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส จากการศึกษาพบว่า อุณหภูมิในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้สูงสุด (Hestrin and Schramm, 1954) Alaban (1962) รายงานว่า ในกระบวนการหมัก *Acetobacter* sp. ในอาหารน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิในช่วง 10-45 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญได้ แต่ไม่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส ซึ่งการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสเริ่มมีการผลิตตั้งแต่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จนถึงช่วงอุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อสามารถเจริญ และผลิตเซลลูโลสในปริมาณสูง แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเกิดผลเสียต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ การเสถียรภาพของโปรตีน โครงสร้างของแฟลกเจลลา ไรโบโซม โปรโตพลาส และไมโทคอนเดรีย (Kováč and Subík, 1970)

2.5.2 วิธีผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส

การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยทั่วไปมักใช้วิธีการหมักแบบตั้งทิ้งไว้ (static culture) และการหมักในสภาวะที่มีการกวน (agitated culture) สำหรับการหมักแบบตั้งทิ้งไว้จำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการผลิตนาน และต้องใช้แรงงานเป็นจำนวนมาก อีกทั้งแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้มีปริมาณน้อย แต่เป็นวิธีที่ค่อนข้างง่าย และนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจะอยู่ในภาชนะทรงตั้งใช้ระยะเวลาเลี้ยงประมาณ 5-10 วัน ได้แบคทีเรียลเซลลูโลสเป็นแผ่น (pellicle) เกือบเต็มภาชนะ สำหรับการหมักในสภาวะที่มีการกวนส่งผลต่อสายพันธุ์แบคทีเรียดั้งเดิมที่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสเกิดการกลายพันธุ์ และสามารถเจริญได้รวดเร็วกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ทำให้ปริมาณของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้มีปริมาณลดลง (Kim *et al.*, 2007) ส่วนการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในถังปฏิกรณ์แบบถังกวน (stirred tank reactor) และแบบอากาศลอยตัว (airlift reactor) ส่งผลให้แบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้ไปยึดเกาะอยู่บริเวณตัวถัง และบริเวณส่วนบนของอุปกรณ์ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำให้เกิดปัญหาและการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสลด (Krystynowicz *et al.*, 2002) ดังนั้น การพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส เพื่อลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงให้น้อยลง และไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแต่ละชนิดมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน สรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 4 และในหัวข้อดังต่อไปนี้

2.5.2.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจานหมุน (Rotating disk bioreactor)

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจานหมุนถูกออกแบบมาโดยให้ส่วนหนึ่งจมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอีกส่วนหนึ่งจะสัมผัสกับอากาศ ในขณะที่จานมีการหมุนอย่างต่อเนื่องบริเวณพื้นผิวของจานจะสัมผัสระหว่างอาหารและอากาศสลับกัน ทำให้จุลินทรีย์ที่ติดอยู่กับพื้นผิวจานสามารถเจริญได้ (Krystynowicz *et al.*, 2002) จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจานหมุน พบว่า ที่ความเร็วในการหมุน 4 รอบต่อนาที และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาณอาหาร (S/V) 0.71 ซม^{-1} สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงสุด (Chawla *et al.*, 2009)

2.6.2.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นจานหมุนชีวภาพ (Rotating biological contactor bioreactor)

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นจานหมุนชีวภาพ ประกอบด้วยจานที่มีลักษณะวงกลมติดตั้งอยู่บนเพลานวนอน เมื่อเพลาก่อเกิดการหมุนบริเวณพื้นผิวของจานจะสัมผัสระหว่างอาหารและอากาศสลับกัน หากมีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดยวิธีนี้จุลินทรีย์จะไม่เผชิญกับแรงเฉือน และมีการถ่ายโอนออกซิเจนได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับถังปฏิกรณ์แบบถังกวน (Chawla *et al.*, 2009) Kim *et al.* (2007) ศึกษาการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแผ่นจานหมุนชีวภาพโดยใช้ *Gluconacetobacter* sp. พบว่า มีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสสูงสุดที่ 5.52 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นจานหมุนชีวภาพที่มีจาน 8 อัน และเมื่อมีการเติมอากาศที่ 1.25 VVM การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสสูงถึง 5.67 กรัมต่อลิตร ส่วนความเร็วในการหมุนที่ดีที่สุดคือ 15 รอบต่อนาที

2.6.2.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัว (Airlift bioreactor)

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัวเป็นถังที่ใช้พลังงานต่ำ เมื่อเทียบกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ซึ่งเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งสำหรับการใช้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส Chao *et al.* (1997) ศึกษาการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัวสำหรับการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสเป็นครั้งแรก โดยให้อากาศเข้าทางด้านล่าง และให้อากาศมีการไหลเวียนในอาหาร ต่อมา Chao *et al.* (2000) ได้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัวที่ไหลเวียนภายใน (internal-loop airlift reactor) ขนาด 50 ลิตร พบว่า สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้ 3.8 กรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 67 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบความแตกต่างของถึงปฏิกรณณ์ชีวภาพแต่ละชนิดสำหรับการผลิตแบคทีเรียผลิตเซลลูโลส

ชนิดถึงปฏิกรณณ์ชีวภาพ	ข้อดี	ข้อเสีย	การผลิต	ผลได้
Airlift reactor	<ul style="list-style-type: none"> -ความเข้มข้นของเซลล์สูงผลิตสูง -ได้ผลิตภัณฑ์สูง -ความเค้นเฉือน (shear stress) ต่ำ 	<ul style="list-style-type: none"> -ใช้พลังงานสูง -การติดตั้งใช้ระยะเวลานาน 	0.056–0.116 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง	3.80–8.70 กรัมต่อลิตร
Rotating disk reactor	<ul style="list-style-type: none"> -ความเข้มข้นของเซลล์สูง -เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ออกซิเจน 	<ul style="list-style-type: none"> -การผลิตเป็นแบบกึ่งต่อเนื่อง -เสี่ยงต่อการปนเปื้อนสูง 	0.015 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง	5.35 กรัมต่อลิตร
Biofilm reactor	<ul style="list-style-type: none"> -ความเข้มข้นของเซลล์สูง -ได้ผลิตภัณฑ์สูง -ง่ายต่อการแยกผลิตภัณฑ์ 	<ul style="list-style-type: none"> -เซลล์อาจมีการปนเปื้อน -การประยุกต์ใช้ในงานที่มีขนาดใหญ่ -พื้นที่ได้ยาก 	0.82 กรัมต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง	
Fluidized bed reactor	<ul style="list-style-type: none"> -อุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงสม่ำเสมอ -ใช้งานในระยะเวลานานได้ -อนุภาคผสมเข้ากันได้ 	<ul style="list-style-type: none"> -ใช้พลังงานสูง -การติดตั้งใช้ระยะเวลานาน -เกิดความเค้นเฉือน (shear stress) 	0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง	5.80 กรัมต่อลิตร
Stirred tank reactor	<ul style="list-style-type: none"> -ความเข้มข้นของเซลล์สูง -ได้ผลิตภัณฑ์สูง -ใช้งานในระยะเวลานานได้ 	<ul style="list-style-type: none"> -เกิดความเค้นเฉือน (shear stress) -ใช้พลังงานในการผสมสูง 	0.058–0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง	4.57–13 กรัมต่อลิตร

ที่มา ดัดแปลงมาจาก Lin *et al.* (2013)

2.6 การประยุกต์แบคทีเรียลเซลลูโลส

นับตั้งแต่เริ่มมีการศึกษาแบคทีเรียลเซลลูโลสพบว่า แบคทีเรียลเซลลูโลสมีสมบัติที่โดดเด่นหลายประการ เช่น มีความบริสุทธิ์สูง ทนต่อแรงดึงสูง ความหนาแน่นของผลึกสูง มีปริมาณน้ำสูง และรูปร่างมีความคงตัว เนื่องจากคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้มีการศึกษาเพื่อนำแบคทีเรียลเซลลูโลสไปพัฒนาศักยภาพและประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ เช่น สิ่งทอ กระดาษ อาหาร ยา การบำบัดน้ำเสีย ลำโพงคุณภาพดี และโรงกลั่น (Lin *et al.*, 2013) การนำแบคทีเรียลเซลลูโลสไปประยุกต์ดัดแปลง และพัฒนาการใช้งาน สรุปได้ดังตารางที่ 5 และ 6 และในหัวข้อดังต่อไปนี้

2.6.1 การประยุกต์ด้านอาหาร

การประยุกต์ใช้เซลลูโลสบริสุทธิ์ พบว่า ถูกนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความหนืดและใช้เป็นสารให้ความคงตัวในการแปรรูปอาหาร Okiyama *et al.* (1992) รายงานว่า มีการนำเซลลูโลสมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยเติม 3 เปอร์เซ็นต์ ของเซลลูโลส ลงไปในเครื่องตีหม้อช็อคโกแลต แทนการใช้แซนแทนกัม (xanthan gum) พบว่า เครื่องตีหม้อช็อคโกแลตมีความหนืดเช่นเดียวกับการเติมแซนแทนกัม แต่เมื่อเครื่องตีได้รับความร้อนพบว่า ความหนืดของเครื่องตีที่เติมแซนแทนกัมลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่เครื่องตีที่เติมเซลลูโลสความหนืดไม่ลดลง นอกจากนี้ มีการเติมเซลลูโลสลงไปใต้อุณหภูมิเพื่อป้องกันการไหลหลังจากอุณหภูมิละลาย ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มความเค้นเฉือน (shear stress) และปรากฏผลเช่นเดียวกับการเติมเซลลูโลสลงไปเต้าหู้ แบคทีเรียลเซลลูโลสเป็นสารที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร และเป็นสารที่ผ่านการรับรองโดยองค์การอาหารและยา (FDA) ว่าเป็นสารที่สามารถใช้เติมลงไปในการได้อย่างปลอดภัย (generally recognized as safe; GRAS) (Lin *et al.*, 2013)

2.7.2 การประยุกต์ในการผลิตกระดาษ

Johnson and Neogi (1989) รายงานว่า แบคทีเรียลเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นเม็ด ๆ มีลักษณะเส้นใยเป็นกิ่งเหมือนตาข่าย ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการกวน เหมาะสำหรับการนำมาผลิตเป็นกระดาษที่มีคุณภาพสูง และได้มีการเติมแบคทีเรียลเซลลูโลสลงในกระดาษ เพื่อให้กระดาษทนต่อแรงดึงสูง อีกทั้งยังทำให้กระดาษไม่เกิดการฉีกขาดได้ง่าย (Yamanaka and Watanabe, 1994) Iguchi *et al.* (2000) พบว่า เมื่อเติม 15 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียลเซลลูโลสลงไปในการกระบวนการผลิตกระดาษทำให้กระดาษทนต่อการพับสูง เมื่อเปรียบเทียบกับกระดาษเยื่อบริสุทธิ์ นอกจากนี้ โมดูลัสของยัง (Young's modulus) เพิ่มขึ้นจาก 2.0 เป็น 3.5 (GPa)

2.7.3 การประยุกต์ในการทำไดอะแฟรมแปลงความถี่เสียง

Yamanaka and Watanabe (1994) ศึกษาถึงศักยภาพและการใช้แบคทีเรียลเซลลูโลส โดยนำมาเป็นองค์ประกอบพื้นผิวของตัวแปลงความถี่เสียง พบว่า แบคทีเรียลเซลลูโลสมีความคงตัวสูง ซึ่งวัดได้จากค่ามอดูลัสของยัง (Young's modulus) ควบคู่กับการสูญเสียภายในของวัสดุที่สูง จึงเหมาะสำหรับนำมาประยุกต์ใช้เป็นไดอะแฟรมของลำโพง ทำให้ได้ไดอะแฟรมที่มีสมบัติให้เสียงสูงที่ดี มีความเร็วเท่ากับอลูมิเนียม และลดเสียงรบกวนได้ดี จากนั้นบริษัทโซนี่ได้นำไปประยุกต์เพื่อผลิตเป็นลำโพงและหูฟัง (Iguchi *et al.*, 2000)

2.7.4 การประยุกต์ด้านเภสัชกรรม

กระบวนการสร้างเนื้อเยื่อเพื่อรักษาบาดแผลเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนต่าง ๆ เช่น คอลลาเจน เจลาติน และโปรทีโอไกลแคน ที่อยู่ใน extracellular matrix molecules (ECM) ในชั้นของเนื้อเยื่อ เพื่อกระบวนการรักษาตัวเอง (Eming *et al.*, 2002) Winter (1962) พบว่า ความชุ่มชื้น (moist environment) ของบาดแผล ส่งผลให้การรักษาบาดแผลและการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (re-epithelialization) มีประสิทธิภาพมากขึ้น ด้วยเหตุนี้ จึงมีการนำแบคทีเรียลเซลลูโลสมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุตกแต่งแผล เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น (Alvarez *et al.*, 2009; Czaja *et al.*, 2006; Legeza *et al.*, 2004) ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์รักษาบาดแผลชนิดต่าง ๆ ออกมาจำหน่ายเป็นจำนวนมาก เพื่อลดความถี่ในการทำแผลและคงความชุ่มชื้นโดยไม่ต้องทำแผลบ่อย เรียกการปิดแผลประเภทนี้ว่าการปิดแบบปิดแน่น (occlusive) หรือกึ่งปิดแน่น (semi-occlusive) เช่น hydrocolloid, silver coated dressing และ cellulose ซึ่งพบว่า การใช้ hydrocolloid กับแผล donor sites ซึ่งเป็นแผลลึกระดับสอง (superficial) และแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวกระดับสอง พบว่าระยะเวลาเฉลี่ยในการหายของแผลเท่ากับ 8.2 และ 10.2 วัน ตามลำดับ ซึ่งได้ผลดีกว่าการทำแผลแบบเดิมที่ใช้ปิดด้วยผ้าก๊อช หรือผ้าก๊อชเคลือบซิลเวอร์ซัลฟาครีม (Wiechula, 2003; Wyatt *et al.*, 1990) นอกจากนี้ เมื่อทำแผล การลอกแผ่น hydrocolloid ในบางระยะของแผลที่กำลังสร้างเนื้อเยื่อส่งผลให้เจ็บปวดและเนื้อเยื่อบาดเจ็บได้ (Collier and Hollinworth, 2000) สำหรับกรณีนี้มีผลิตภัณฑ์ชนิดแผ่นเซลลูโลสที่ได้รับการรายงานผลว่าดีด้านการลอกออกง่าย และลดอาการเจ็บแผล แผ่นเซลลูโลสที่ใช้ในทางการแพทย์มีหลายชื่อการค้า เช่น Biofill[®], Bioprocess[®] และ Xcell[®] ผลการใช้แผ่นเซลลูโลสรักษาแผลประเภท non-healing venous leg ulcers พบว่า ระยะเวลาการหายของแผล และอาการปวดแผลดีกว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีมาตรฐาน (Alvarez *et al.*, 2004) และแผ่นเซลลูโลสยังช่วยลดการสร้างเนื้อเยื่อที่มากเกินไป (hypertrophic-granulation) ช่วยลดเนื้องอก นอกจากนี้ แผ่นเซลลูโลสยังช่วยรักษาสภาพความชื้นที่เหมาะสมแก่แผล ไม่ติดผิวหนังเวลาแกะเปลี่ยนทำแผล เหมาะสำหรับปิดแผลที่มีสารคัดหลั่งมาก (Watanasit *et al.*, 2009)

ตารางที่ 5 การประยุกต์แบบคทีเรียลเซลล์โลส

การประยุกต์ใช้	ประโยชน์
การออกใหม่ของกระดูก (Bone regeneration)	แบบคทีเรียลเซลล์โลสจัดเป็นโครงสร้างนั่งร้าน (scaffold) ที่ดี เพราะสามารถส่งเสริมการออกของเซลล์กระดูก และเนื่องจากโครงสร้างที่มีรูพรุนทำให้มีศักยภาพเป็นที่ยึดเกาะของเซลล์กระดูกที่สร้างใหม่
การตรึงเอนไซม์ (Enzyme immobilization) ไดอะแฟรมลำโพง (Acoustic speaker diaphragm)	แบบคทีเรียลเซลล์โลสทำหน้าที่เป็นตัวยึดตรึงรูเอนไซม์โดยใช้การเปลี่ยนแปลงทางเคมีบนพื้นผิว ทำให้ได้คุณภาพของเสียงดีขึ้น เมื่อเทียบกับการใช้วัสดุชนิดอื่น
ตัวนำส่งยา (Drug carrier) บรรจุภัณฑ์ (Packaging)	แบบคทีเรียลเซลล์โลสสามารถอุ้มน้ำสูงเนื่องจากโครงสร้างที่มีรูพรุนทำให้มีศักยภาพในการขนส่งยา ป้องกันการปนเปื้อนและป้องกันการแตกหักของผลิตภัณฑ์
เยื่อเลือกผ่าน (Dialysis membrane) รูพะดูของผนังกันช่องจมูก (nasal septal perforation)	สามารถใช้สำหรับการเคลื่อนที่แลกเปลี่ยนสารด้วยตัวทำละลายหรือด้วยการออสโมซิสได้ เนื่องจากคุณสมบัติทางชีวภาพที่มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย ทำให้สามารถใช้เพื่อทดแทนเนื้อเยื่ออ่อนบางชนิดได้ เช่น ผนังกันช่องจมูก
วัสดุตกแต่งบาดแผล (Wound dressing)	เนื่องจากมีสามารถอุ้มน้ำสูง และมีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อในร่างกาย
หลอดเลือดเทียม (Artificial blood vessel)	เมื่อนำแบบคทีเรียลเซลล์โลสมาเคลือบด้วยเยื่อไ้แท้บางชนิด หรือนำมาผ่านกระบวนการทางเคมี ทำให้แบบคทีเรียลเซลล์โลสสามารถนำมาใช้ในการสร้างเส้นเลือดเทียมในวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้
องค์ประกอบของกระดาษ (Composite paper)	ทำให้กระดาษมีความแข็งแรง ทนต่อการฉีกขาด และทนต่อการพับหรือยับ

ที่มา ดัดแปลงมาจาก Lin *et al.* (2013)

ตารางที่ 6 การพัฒนาและตัดแปลงแบบคทีเรียลเซลล์โดยการเพิ่มองค์ประกอบบางชนิด

องค์ประกอบเพิ่มเติม		ประโยชน์
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส	มีบทบาทในการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของวัสดุที่ทำจากแบคทีเรียลเซลล์	
ไคโตซาน	เพื่อเพิ่มการยึดเกาะของเซลล์ และพัฒนาเป็นโครงสร้างนั้ร้งสำหรับการตรึงเซลล์	
ซีตไพเพอร์คาร์บอนกัมมันต์	เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษ	
โซเดียมคาร์บอเนต	เมื่อผสมกับแบคทีเรียลเซลล์ให้ป็นสารที่มีความคงตัวสูง ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตกระดาษ	
โซลโกลูแคน	เมื่อนำมารวมกับแบคทีเรียลเซลล์ทำให้เกิดเป็นผลึกขนาดนาโนสังผลให้พินผิวเรียบ	
ฟีนอลเรซินหรือเส้นใยคาร์บอน	เพื่อช่วยให้เส้นใยสามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นได้ง่าย	
อนุภาคเงินนาโน	ใช้สำหรับคัดยกรรรมบาดแผล เนื่องจากมีความสามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้	
อนุภาคนิกเกิลนาโน	ใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติของแบคทีเรียลเซลล์ เพื่อเป็นวัสดุสำหรับการพิมพ์แม่แกนน็อทรกพี และประยุกต์เป็นเซ็นเซอร์ อีกทั้งยังใช้เป็นโครงสร้างนั้ร้งเพื่อเป็นที่ยึดเกาะเมื่อเยื่อ	
อนุภาคทองนาโน	ใช้เป็นแม่แบบสำหรับการตรึงเอนไซม์ และการประดิษฐ์ไบโอเซนเซอร์	
อนุภาควาเนเดียมออกไซด์นาโน	ใช้เป็นสารที่ทำให้แบคทีเรียลเซลล์โปร่งใส และสามารถนำไฟฟ้าได้	
ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส	ใช้ในการปรับปรุงความสามารถในการอุ้มน้ำของแบคทีเรียลเซลล์ในระหว่างการผลิต	

ที่มา ดัดแปลงมาจาก Lin et al. (2013)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Absolute ethanol (C_2H_5OH)	RCI Labscan, Thailand
Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$)	CDH, India
Calcium carbonate ($CaCO_3$)	Fluka, USA
Citric acid anhydrous ($C_6H_8O_7$)	QRëC, New Zealand
D(+)-Glucose monohydrate ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	QRëC, New Zealand
3,5-Dinitrosalicylic acid; DNS ($C_7H_4N_2O_7$)	Sigma, USA
Hydrochloric acid (HCl)	ACI Labscan, Thailand
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	ACI Labscan, Thailand
Phenol (C_6H_6O)	PanReac, Spain
Potassium chloride (KCl)	Fluka, USA
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	Merck, Germany
Potassium sodium tartrate ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)	DaeJung, Korea
Sodium chloride (NaCl)	ACI Labscan, Thailand
Sodium hydroxide (NaOH)	ACI Labscan, Thailand
Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)	Fluka, USA
Sodium sulfite (Na_2SO_3)	Carlo Erba, France
Sulfuric acid 98% (H_2SO_4)	ACI Labscan, Thailand

3.2 เครื่องมือ

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) รุ่น SU5000, Hitachi

เครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาให้ความร้อน (Hot plate and magnetic stirrer) รุ่น VS-130SH, Scientific

เครื่องเคลือบชิ้นงานด้วยการพ่นไอออน (Rotary-pumped sputter coater) รุ่น Q150R S, Quorum

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance) รุ่น ME3002E, Mettler Toledo

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance) รุ่น ME204E, Mettler Toledo

เครื่องทำแห้งตัวอย่าง ณ จุดวิกฤต (Critical point dryer; CPD) รุ่น K850, Quorum

เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) รุ่น CoolSafe 55-4 Pro, Scanvac

เครื่องนึ่งความดัน (Autoclave) รุ่น Ss-325 และ รุ่น Ss-700, Tomy

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Z 36 HK, Hermle

เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G560E, Scientific Industries

เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier transform infrared spectrometer; FTIR) รุ่น ID7 ATR, Thermo Fisher Scientific

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น WPA Biowave II, Biochrom

เครื่องวัดค่าการเปลี่ยนแปลงความร้อน (Differential scanning calorimeter, DSC) รุ่น dsc1, Mettler Toledo

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) รุ่น F20, Mettler Toledo

เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-ray Diffractometer; XRD) รุ่น MiniFlex II, Rigaku

เครื่องอบความร้อนแห้ง (Hot air oven) รุ่น ULM 500, Memmert

เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ความเร็วสูง (High speed homogenizer) รุ่น X10/25, Ystral

ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -85 (Deep freezer) รุ่น NU-6500E, Nuaire

ตู้อบเชื้อ (Incubator) รุ่น CLW115, Pol-Eko-Aparatura

ตู้อบเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) รุ่น Innova® 43R, New Brunswick

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow class 2) รุ่น AIB3, NuAire

ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) รุ่น SP-2A, Sahaburapa

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WB-22, Wisd

3.3 อุปกรณ์อื่น ๆ

- กรวยกรองแก้ว (Filtering funnel)
- กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร เบอร์ 1 (Filter paper)
- กระบอกตวง (Cylinder)
- ขวดฉีดน้ำกลั่น (Wash bottle)
- ขวดปรับปริมาตรขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (Volumetric flask)
- ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร (Erlenmeyer flask)
- ขวดแก้วใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร (Clear glass bottles)
- ขวดใส่สารละลาย (Laboratory bottle)
- เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม (Loop)
- คิวเวทท์แก้วขนาด 3 มิลลิลิตร (Glass cuvette)
- คีมคีบ (Forcep)
- เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Dispenser)
- จานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 90 × 15 มิลลิเมตร (Petri dish)
- ชุดกรองสุญญากาศ (Filtration system)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
- ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test tube rack)
- ตะแกรงใส่หลอดปั่นเหวี่ยงไมโคร (Micro centrifuge rack)
- ถุงมือไนไตร (Nitrile rubber glove)
- โถดูดความชื้น (Desiccator)
- เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
- แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)
- แท่งแม่เหล็กคนสาร (Magnetic bar)
- บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร (Beaker)
- บีกเกอร์แบบมีหูจับ (Measuring jug)
- แผ่นฟอยล์อลูมิเนียม (Aluminum foil)
- พาราฟิล์ม (Parafilm)
- ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip)
- สำลี (cotton)
- หลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร (Test tube)

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเก็บตัวอย่างและการเตรียมน้ำข้าวข้าว

เก็บตัวอย่างน้ำข้าวข้าวจากแหล่งต่าง ๆ ภายในมหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม จากนั้นนำน้ำข้าวข้าวมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดเศษข้าวและตะกอนต่าง ๆ นำส่วนใสที่ได้มาผ่านการกรองโดยใช้กระดาษกรองขนาดรูพรุน 11 ไมโครเมตร (Whatman No.1) เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่อาจไม่ตกตะกอน เก็บส่วนใสของน้ำข้าวข้าวที่ผ่านการกรองมาวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-Sulfuric (ภาคผนวก ข) (Dubois et al., 1956) และน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (ภาคผนวก ข) (Miller, 1959) เพื่อใช้สำหรับการเตรียมนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำข้าวข้าว (water from washing rice medium; WWR) (ภาคผนวก ก) เป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

3.4.2 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อ

เก็บตัวอย่างผลไม้จากตลาดต่าง ๆ ภายในอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม โดยคัดเลือกผลไม้ที่สุกงอม และตัดชิ้นตัวอย่างผลไม้ น้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง HS (Hestrin-Schramm) (ภาคผนวก ก) (Hestrin and Schramm, 1954) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) จากนั้นนำหลอดตัวอย่างที่มีแผ่นฟิล์มเซลล์ลอยอยู่บนผิวของอาหารเพาะเลี้ยงมาคัดแยกเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูลอส โดยการ streak ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง HS และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน และแยกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวนม (milk-white) มีความนูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร (Convex) และผิวหน้าของโคโลนีเรียบ (Smooth) มาเพาะเลี้ยงในอาหาร HS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน อีกครั้ง เพื่อกำจัดเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูลอส และนำเชื้อที่คัดเลือกได้มาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อที่ได้ ในอาหารเพาะเลี้ยง SH ที่มีไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการศึกษาต่อไป

3.4.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

ดูดเชื้อจากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง YE ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) จากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง YE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) เมื่อครบเวลาจะสังเกตเห็นแผ่นฟิล์มเซลล์ูลอสลอยอยู่บนผิวของอาหาร จากนั้นนำมาทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน

โดยเครื่องโฮมจีในซ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที และนำไปกรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น ในสภาวะปลอดเชื้อทุกขั้นตอน (Joseph *et al.*, 2003) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.8 เพื่อใช้เป็นความเข้มข้นของกล้าเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียลเซลล์ูลอส

ปริมาณแบคทีเรียลเซลล์ูลอสวิเคราะห์ในรูปของน้ำหนักแห้ง โดยนำแผ่นแบคทีเรียลเซลล์ูลอสที่ลอยอยู่บนผิวหน้าของอาหารเพาะเลี้ยงล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง และนำไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดเซลล์และอาหารเพาะเลี้ยงที่ติดอยู่ในแผ่นแบคทีเรียลเซลล์ูลอสออก นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง และแช่ไว้ในน้ำกลั่นจนกระทั่งพีเอชของน้ำกลั่นเป็นกลาง จากนั้นนำแผ่นแบคทีเรียลเซลล์ูลอสไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน หรืออบจนกว่าน้ำหนักของแผ่นแบคทีเรียลเซลล์ูลอสคงที่ (Joseph *et al.*, 2003)

3.4.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูลอส

3.4.5.1 การศึกษาชนิดของอาหารต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูลอส

ถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง HS และ YE ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พีเอชเท่ากับ 5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) และเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักของแบคทีเรียลเซลล์ูลอสแห้งตามข้อ 3.4.4

3.4.5.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูลอสในอาหาร *water from washing rice medium (WWR)*

3.4.5.2.1 ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง

ถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน แทนการเติมน้ำตาลกลูโคส ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง WWR เท่ากับ 5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) เริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียลเซลล์ูลอสตามข้อ 3.4.4 จนกระทั่งน้ำหนักแห้งของการผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูลอสคงที่

3.4.5.2.2 พีเอช

ถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน แทนการเติมน้ำตาลกลูโคส ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง WWR เท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) โดยใช้ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.1 วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียลเซลล์ตามข้อ 3.4.4

3.4.5.2.3 ความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 2, 5, 8, 10, 13 และ 19 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน แทนการเติมน้ำตาลกลูโคส ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง WWR เท่ากับพีเอชจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.2 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) โดยใช้ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่เชื้อสามารถผลิตแบคทีเรียลเซลล์ได้สูงสุดจากการศึกษาในข้อ 3.4.2.2.1 วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียลเซลล์ตามข้อ 3.4.4

3.4.5.2.4 อุณหภูมิ

ถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้นจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.3 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3 ลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน แทนการเติมน้ำตาลกลูโคส ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง WWR เท่ากับพีเอชจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.2 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4, 25, 30, 35 และ 60 องศาเซลเซียส ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) โดยใช้ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.1 วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียลเซลล์ตามข้อ 3.4.4

3.4.5.2.5 ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต

ถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้นจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.3 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3 ลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการเติมน้ำตาลกลูโคส ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง WWR เท่ากับพีเอชจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.2 และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, และ 4.0 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.4 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) โดยใช้ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.1 วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสตามข้อ 3.4.4

3.4.5.2.6 ความเข้มของผงวุ้น

ถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้นจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.3 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3 ลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการเติมน้ำตาลกลูโคส ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง WWR เท่ากับพีเอชจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.2 และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.5 และเติมผงวุ้นความเข้มข้น 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.4 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) โดยใช้ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.1 วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสตามข้อ 3.4.4

3.4.5.3 การศึกษาวิธีผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในอาหาร WWR และ YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) และแบบเขย่า (agitate culture)

ถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้นจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.3 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.3 ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง YE และอาหารเพาะเลี้ยง WWR ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยอาหาร WWR ใช้น้ำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน แทนการเติมน้ำตาลกลูโคสในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.1 และปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับพีเอชจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.2 เติมน้ำเกลือคาร์บอนที่ความเข้มข้นที่จากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.5 และเติมผงวุ้นที่ความเข้มข้นจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.6 จากนั้นนำไปหมักที่อุณหภูมิจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.4 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) และแบบเขย่า (agitate culture) โดยใช้ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงจากการศึกษาในข้อ 3.4.5.2.1 จากนั้นนำแผ่นแบคทีเรียเซลลูโลสที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) ด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง รุ่น CoolSafe 55-4 Pro บริษัท Scanvac เป็นเวลา 2 วัน หรือจนกว่าแผ่นแบคทีเรียเซลลูโลสแห้งสนิท เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักแห้งและใช้ศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียเซลลูโลสตามข้อ 3.4.6 ต่อไป

3.4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way ANOVA) กำหนดระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ และการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 21

3.4.7 การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียเซลลูโลส

3.4.7.1 การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

นำแผ่นแบคทีเรียเซลลูโลสที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.5.3 ขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร วางลงบนที่ใส่ตัวอย่าง (stub) โดยใช้คาร์บอนเทปยึดติดตัวอย่าง นำไปเคลือบทองด้วยเครื่อง Rotary-pumped sputter coater รุ่น Q150R S ผลิตโดยบริษัท Quorum และวิเคราะห์สัญญาณด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) รุ่น SU5000 ผลิตโดยบริษัท Hitachi ค่าความต่างศักย์ (accelerating voltage) 3.0 กิโลโวลต์ จากนั้นนำภาพที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแบคทีเรียเซลลูโลสโดยการสุ่มเส้นใยมาจำนวน 50 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม ImageJ version 1.51J8 (Bilgi *et al.*, 2016)

3.4.7.2 การวิเคราะห์ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FT-IR)

นำแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.5.3 ขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร วางบนแท่นวางตัวอย่างของเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ รุ่น NICOLET iS5 ผลิตโดยบริษัท Thermo Scientific ที่มี Attenuated Total Reflectance (ATR) รุ่น iD7 ATR ผลิตโดยบริษัท Thermo Scientific เป็นอุปกรณ์เสริม โดยตั้งค่าช่วงวิเคราะห์ที่เลขคลื่น (scan range) 4,000-400 cm^{-1} ความละเอียด (resolution) 4 cm^{-1} (Fan *et al.*, 2016)

3.4.7.3 การวิเคราะห์ด้วยเอกซเรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray diffraction; XRD)

นำแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.5.3 ขนาด 10 x 10 x 2 มิลลิเมตร วางลงบน sample holder โดยใช้เทปใสยึดติดตัวอย่าง และใช้ด้านผิวหน้าที่เรียบที่สุดใน การวิเคราะห์ นำไปวางในตำแหน่งที่วางสารของเครื่อง X-Ray Diffractometer รุ่น MiniFlex II ผลิตโดยบริษัท Rigaku ซึ่งปรับกระแส 30 มิลลิแอมป์ ความต่างศักย์ 40 กิโลโวลต์ ใหญ่กับหลอดกำเนิดรังสี ตั้งค่าอัตราการหมุนของโกนิโอมิเตอร์ที่ 2 θ และตั้งพิสัยค่ามุมของการเลี้ยวเบนของรังสี เอกซที่ 3-70 องศา ด้วยอัตราเร็ว 2 องศาต่อนาที สเปกตรัมที่ได้เป็นการพล็อตระหว่างค่า Intensity (Cps.) ในแกน Y และค่ามุม 2-theta (deg.) ในแกน X จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างผลึก (Crystalline Structure) (Bilgi *et al.*, 2016)

3.4.7.4 การวิเคราะห์ด้วยดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential Scanning Calorimetry; DSC)

นำแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.5.3 น้ำหนัก 7 มิลลิกรัม ใส่ลงในภาชนะที่ใช้สำหรับใส่สารตัวอย่าง (Sample Pan) และนำไปวางบนอุปกรณ์ให้ความร้อน (Furnace) เมื่อเริ่มการทดลอง Furnace เริ่มให้ความร้อนแก่ภาชนะ โดยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC) รุ่น STAR SW 10.00 ผลิตโดยบริษัท Mettler Toledo ซึ่งใช้สภาวะการวิเคราะห์ดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น	50.0	องศาเซลเซียส (คงที่ไว้ 5 นาที)
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	10.0	องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิสุดท้ายเป็น	300.0	องศาเซลเซียส
อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน	30.0	มิลลิลิตรต่อนาที

ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปของเทอร์โมแกรมพล็อตระหว่างการเปลี่ยนแปลงพลักซ์ความร้อน (มิลลิวัตต์) กับอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) เมื่อแบคทีเรียลเซลลูโลสได้รับความร้อนเกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะทางโครงสร้างและทางเคมี ทำให้ทราบค่าจุดหลอมเหลว (Melting point) ของแบคทีเรียลเซลลูโลสได้ (Fan *et al.*, 2016)

บทที่ 4

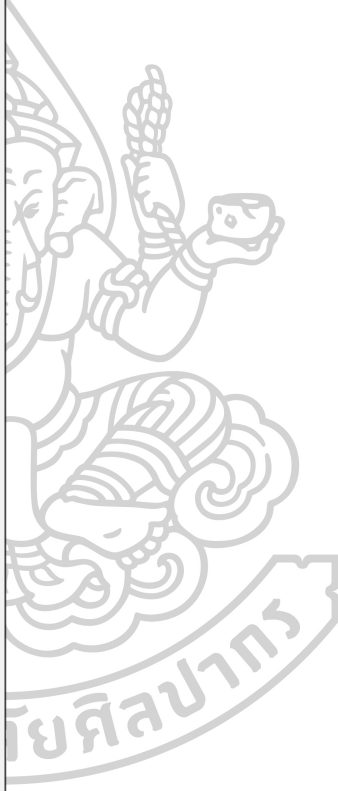
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

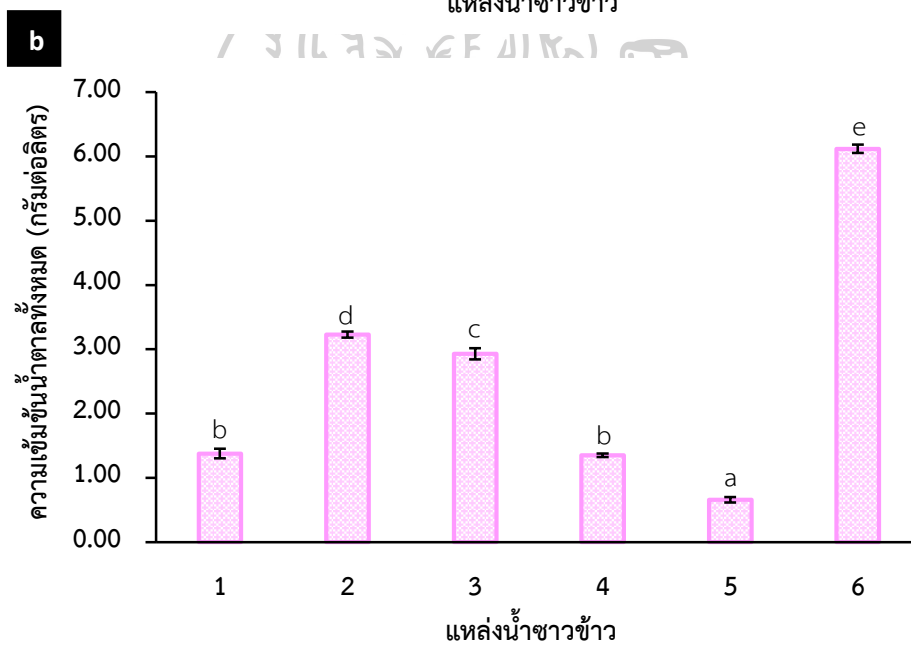
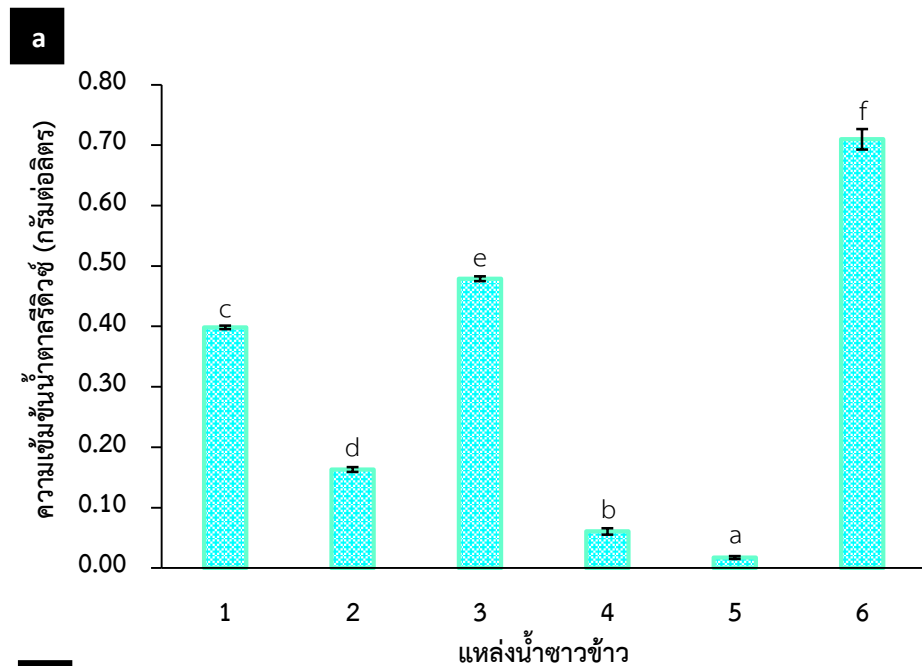
4.1 การศึกษาตัวอย่างน้ำข้าวข้าว

สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำข้าวข้าวในการศึกษาเพื่อผลิตแบคทีเรียแลคโตบาซิลัส เก็บจากร้านจำหน่ายอาหารจำนวน 6 ตัวอย่าง ภายในมหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม ดังแสดงในตารางที่ 7 จากนั้นนำน้ำข้าวข้าวที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดเศษข้าวและตะกอนต่าง ๆ นำส่วนใสที่ได้มาผ่านการกรองโดยใช้กระดาษกรองขนาดของรูพรุน 11 ไมโครเมตร อีกครั้งเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่อาจไม่ตกตะกอน เก็บส่วนใสของน้ำข้าวข้าวที่ผ่านการกรองมาวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric พบว่าตัวอย่างน้ำข้าวข้าวที่ 6 คือ ร้านคุณมรจากโรงอาหารยูเนียน ซึ่งเป็นข้าวหอมมะลิ トラ ๙ ดี ผลิตโดยโรงสีทรัพย์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 6.12 กรัมต่อลิตร และตัวอย่างน้ำข้าวข้าวที่ 1 ถึง 5 มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 1.38, 3.23, 2.93, 1.35 และ 0.66 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 6b เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS พบว่าตัวอย่างน้ำข้าวข้าวที่ 6 คือ ร้านคุณมรจากโรงอาหารยูเนียน มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 0.71 กรัมต่อลิตร และตัวอย่างน้ำข้าวข้าวที่ 1 ถึง 5 มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 0.40, 0.16, 0.48, 0.06 และ 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 6a ดังนั้น จึงเลือกน้ำข้าวข้าวร้านคุณมรจากโรงอาหารยูเนียนเพื่อใช้สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำข้าวข้าว (water from washing rice medium; WWR) เป็นแหล่งคาร์บอน และปรับลดความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดให้ต่ำกว่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดจริงที่วัดได้ เพื่อช่วยลดปัญหาความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในน้ำข้าวข้าวที่ไม่แน่นอน เมื่อนำมาทดลองในครั้งต่อไป โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร ทุกการทดลอง จากการศึกษากาการผลิตแบคทีเรียแลคโตบาซิลัสของ Masaoka *et al.* (1993) พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 6, 12, 24 และ 48 กรัมต่อลิตร มีการนำกลูโคสไปใช้เท่ากับ 100, 100, 68 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น ตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่สูงเกินไป แบคทีเรียมีการนำไปใช้น้อยกว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคสที่ต่ำ และหากความเข้มข้นของกลูโคสสูงเกินไปส่งผลต่อความสิ้นเปลืองกลูโคสที่เติมลงไปโดยปราศจากประโยชน์

ตารางที่ 7 แหล่งที่มาของน้ำข้าวข้าว

ตัวอย่างที่	แหล่งที่มาของน้ำข้าวข้าว	แหล่งที่มาของข้าว
1	ร้านคุณเมอได้คุณะวิศวกรรมศาสตร์ฯ	ข้าวเจ้าในปี ตราเรือใบ ผลิตภัณฑ์โรงสีพื้นที่ อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา
2	ร้านโอเคโรงอาหารเพชรช้อป	ข้าวหอมมะลิ ตรัสสมโอ ผลิตภัณฑ์โรงสีเจริญผล อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา
3	ร้านสุขภาพโรงอาหารเพชรช้อป	ข้าวหอมมะลิ ตร้าช้างไทย ผลิตภัณฑ์โรงสีไทยเกษตร อำเภอปางดะ จังหวัดกาฬสินธุ์
4	ร้านคุณสายสุรีย์โรงอาหารเพชรช้อป	ข้าวเหล็กองอ่อน ตราทองหนึ่ง ผลิตภัณฑ์โรงสีเจริญเกษตร อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม
5	ร้านโอเคโรงอาหารเพชรช้อป (ข้าวกล้อง)	ข้าวมัน (parboiled rice) ตรา Oriba rice บางรัก กรุงเทพมหานคร
6	ร้านคุณมรโรงอาหารยูเนียน	ข้าวหอมมะลิ ตรา ๙ ตี ผลิตภัณฑ์โรงสีทรัพย์ อำเภอคำชะโนด จังหวัดยโสธร





- | | |
|---------------------------------------|--|
| 1 ร้านคุณเอี๊ยะได้คอนะวิศวกรรมศาสตร์ฯ | 4 ร้านคุณสายสุนีย์โรงอาหารเพชรซ้อป |
| 2 ร้านโอเคโรงอาหารเพชรซ้อป | 5 ร้านโอเคโรงอาหารเพชรซ้อป (ข้าวกล้อง) |
| 3 ร้านสุขภาพโรงอาหารเพชรซ้อป | 6 ร้านคุณมรโรงอาหารยูเนี่ยน |

ภาพที่ 6 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) (a) และความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) (b) ของน้ำข้าวข้าวจากแหล่งที่มาต่าง ๆ รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

4.2 การคัดแยกเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส

ตัวอย่างผลไม้ที่นำมาคัดแยกเชื้อจำนวน 38 ตัวอย่าง เก็บมาจากตลาดต่าง ๆ ภายในอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ดังแสดงในตารางที่ 8 โดยคัดเลือกผลไม้ที่สุกงอม และตัดชิ้นตัวอย่างผลไม้ น้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง HS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) ผลการทดลองพบว่า ปรากฏแผ่นเซลลูโลสลอยอยู่บนผิวของอาหารเพาะเลี้ยงเพียง ตัวอย่างเดียว คือตัวอย่างที่ 38 ซึ่งคัดแยกจากแอปเปิ้ล แสดงดังภาพที่ 7a และเมื่อนำไปเขย่าด้วย เครื่องผสมสาร (vortex mixer) ที่ความเร็วสูง ยังคงปรากฏแผ่นเซลลูโลส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา ของ Tanskul *et al.* (2013) ที่รายงานว่า แผ่นเซลลูโลสที่ลอยอยู่บนผิวของอาหารเหลวผลิตได้จาก จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ยังคงปรากฏแผ่นเซลลูโลส เมื่อนำไปเขย่า หรือปั่นเหวี่ยงที่ความสูง จากนั้น คัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส โดยนำหลอดตัวอย่างที่ 38 มา streak ในจาน เพาะเชื้อที่มีอาหาร HS และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน พบว่า มีทั้งหมด 12 ไอโซเลท และนำแต่ละไอโซเลทที่มีลักษณะสีขาวนม (milk-white) มีความนูนโค้งจากผิวหน้า อาหาร (Convex) และผิวหน้าของโคโลนีเรียบ (Smooth) มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร SH และนำไป บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่า มีเพียงไอโซเลทเดียวที่สามารถผลิตแผ่น เซลลูโลสที่ลอยอยู่บนผิวของอาหารเพาะเลี้ยงคือ สายพันธุ์ Li1 ซึ่งมีลักษณะโคโลนีที่ผ่านการแยกให้ บริสุทธิ์ แสดงดังภาพที่ 7b จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ติดสีแดงของซาฟรานิน (safranin) จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) แสดงดังภาพที่ 7c และการศึกษาภายใต้กล้อง จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) พบว่า ลักษณะของ เชื้อสายพันธุ์ Li1 มีรูปร่างเป็นแท่ง ขนาดประมาณ 0.4×5.4 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 7d และ 7e

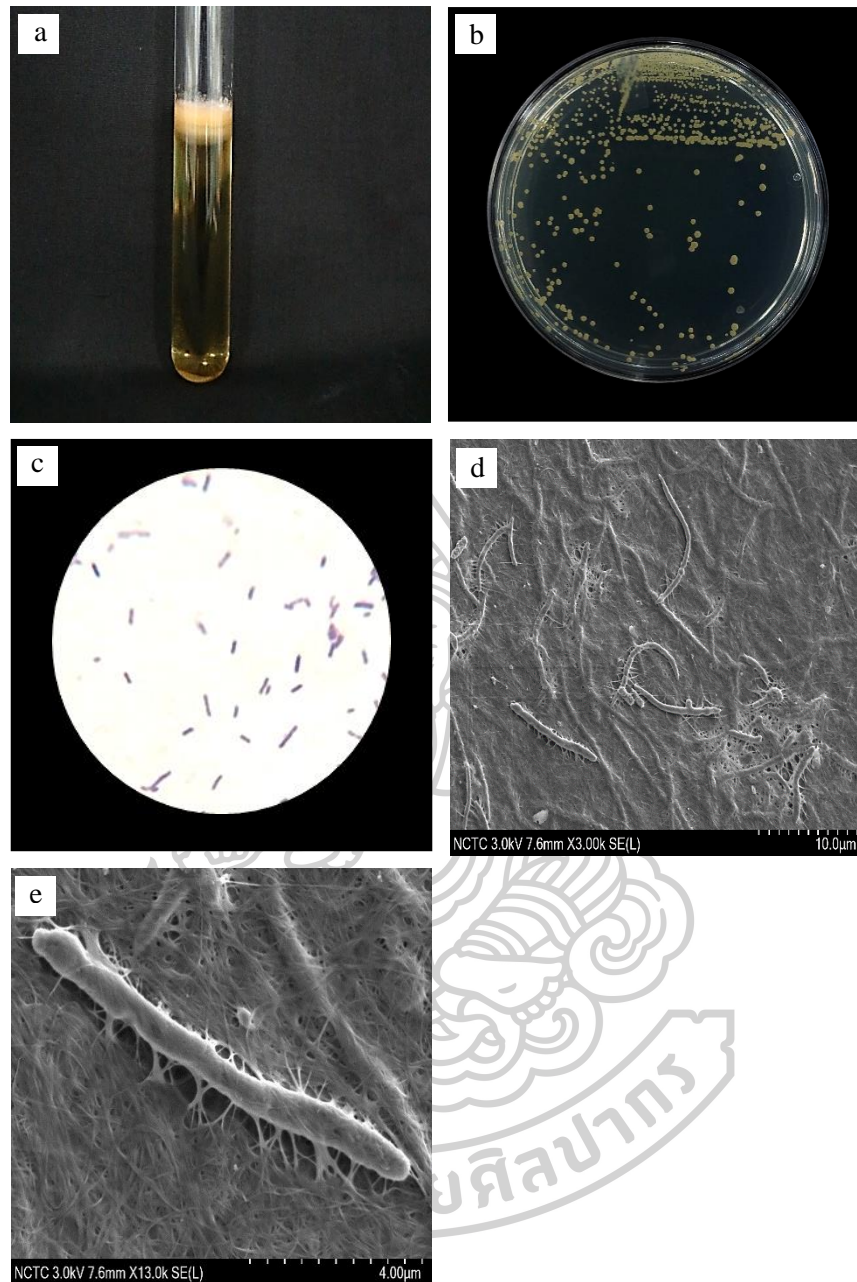
ตารางที่ 8 ชนิดผลไม้และแหล่งที่มาของผลไม้ที่นำมาคัดแยกเชื้อผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส

ตัวอย่างที่	ชนิดผลไม้	แหล่งที่มา
1	กล้วยน้ำว้า (<i>Musa ABB cv. Klwai 'Namwa'</i>)	ตลาดหลังสถานีรถไฟ
2	แก้วมังกร (<i>Hylocercus undatus</i>)	ตลาดปทุมมงคล
3	ขนุน (<i>Artocarpus heterophyllus</i>)	ตลาดปทุมมงคล
4	แคนตาลูป (<i>Cucumis melo</i>)	ตลาดปทุมมงคล
5	เงาะ (<i>Nephelium lappaceum</i>)	ตลาดหลังสถานีรถไฟ
6	ชมพู่มะเหมี่ยว (<i>Syzygium malaccense</i>)	ตลาดกลางผักและผลไม้
7	เชอร์รี่ (<i>Prunus avium</i>)	ตลาดปทุมมงคล
8	แตงโม (<i>Citrullus lanatus</i>)	ตลาดล่างองค์พระปฐมเจดีย์
9	ทับทิม (<i>Punica granatum</i>)	ตลาดล่างองค์พระปฐมเจดีย์
10	ทุเรียนหมอนทอง (<i>Durio zibthinus Murray</i>)	ตลาดปทุมมงคล
11	น้อยหน่า (<i>Annona squamosa</i>)	ตลาดล่างองค์พระปฐมเจดีย์
12	ฝรั่ง (<i>Psidium guajava</i>)	ตลาดหลังสถานีรถไฟ
13	พุทราจีน (<i>Ziziphus jujuba</i>)	ตลาดกลางผักและผลไม้
14	มะขาม (<i>Tamarindus indica</i>)	ตลาดบนองค์พระปฐมเจดีย์
15	มะปราง (<i>Bouea macrophylla</i>)	ตลาดปทุมมงคล
16	มะพร้าว (<i>Cocos nucifera</i>)	ตลาดหลังสถานีรถไฟ
17	มะเฟือง (<i>Averrhoa carambola</i>)	ตลาดบนองค์พระปฐมเจดีย์
18	มะม่วง (<i>Mangifera indica</i>)	ตลาดปทุมมงคล
19	มะยม (<i>Phyllanthus acidus</i>)	ตลาดปทุมมงคล
20	มะละกอ (<i>Carica papaya</i>)	ตลาดปทุมมงคล
21	มังคุด (<i>Garcinia mangostana</i>)	ตลาดบนองค์พระปฐมเจดีย์
22	เมล่อน (<i>Cucumis melo</i>)	ตลาดบนองค์พระปฐมเจดีย์
23	ลองกอง (<i>Lansium domesticum</i>)	ตลาดหลังสถานีรถไฟ
24	ละมุด (<i>Manilkara zapota</i>)	ตลาดกลางผักและผลไม้
25	ลำไย (<i>Dimocarpus longan</i>)	ตลาดล่างองค์พระปฐมเจดีย์

ตารางที่ 8 ต่อ

ตัวอย่างที่	ชนิดผลไม้	แหล่งที่มา
26	ลิ้นจี่ (<i>Litchi chinensis</i>)	ตลาดปฐมมงคล
27	ลูกพลับ (<i>Diospyros kaki</i>)	ตลาดล่างองค์พระปฐมเจดีย์
28	ลูกแพร์ (<i>Pyrus communis</i>)	ตลาดกลางฝักและผลไม้
29	ลูกไหนด (<i>Prunus domestica</i>)	ตลาดกลางฝักและผลไม้
30	สตรอเบอร์รี่ (<i>Fragaria Chiloensis Duchesne</i>)	ตลาดบนองค์พระปฐมเจดีย์
31	ส้มเขียวหวาน (<i>Citrus reticulata</i>)	ตลาดบนองค์พระปฐมเจดีย์
32	ส้มโอ (<i>Citrus maxima</i>)	ตลาดบนองค์พระปฐมเจดีย์
33	สละ (<i>Salacca zalacca</i>)	ตลาดกลางฝักและผลไม้
34	สับปะรด (<i>Ananas comosus</i>)	ตลาดบนองค์พระปฐมเจดีย์
35	สาเก (<i>Pyrus pyriflora</i>)	ตลาดกลางฝักและผลไม้
36	เสาวรส (<i>Passiflora edulis</i>)	ตลาดบนองค์พระปฐมเจดีย์
37	องุ่น (<i>Vitis vinifera</i>)	ตลาดหลังสถานีรถไฟ
38	แอปเปิ้ล (<i>Malus pumila</i>)	ตลาดหลังสถานีรถไฟ





ภาพที่ 7 การคัดแยกเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจากแอปเปิ้ล

แผ่นแบคทีเรียเซลลูโลสบนผิวอาหารเพาะเลี้ยง HS (a), โคโลนีบริสุทธิ์ที่ผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส (b), ลักษณะสัณฐานของเชื้อหลังการย้อมแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (c) และ ลักษณะสัณฐานของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า (d) และ 20,000 เท่า (e) (การเตรียมตัวอย่างส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดอยู่ในภาคผนวก ข)

ตัวอย่างเชื้อสายพันธุ์ Li1 เก็บในอาหารเพาะเลี้ยง SH ที่มีความเข้มข้นไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ร้อยละ 7 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการศึกษาต่อไป จากการศึกษาของ Wiegand and Klemm (2005) พบว่า การเก็บ *A. xylinum* โดยการแช่แข็งในกลีเซอรอลจะส่งผลต่อโครงสร้างของเซลลูโลสที่ผลิตได้ และส่งผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย การแช่แข็งในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ พบว่าแบคทีเรียมีอัตราการรอดสูง และไม่ส่งผลต่อโครงสร้างของเซลลูโลสที่ผลิตแบคทีเรีย และการเก็บในรูปแบบแห้ง พบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อลักษณะสัณฐานวิทยาและโครงสร้างของเซลลูโลส แต่แบคทีเรียมีอัตราการรอดต่ำ

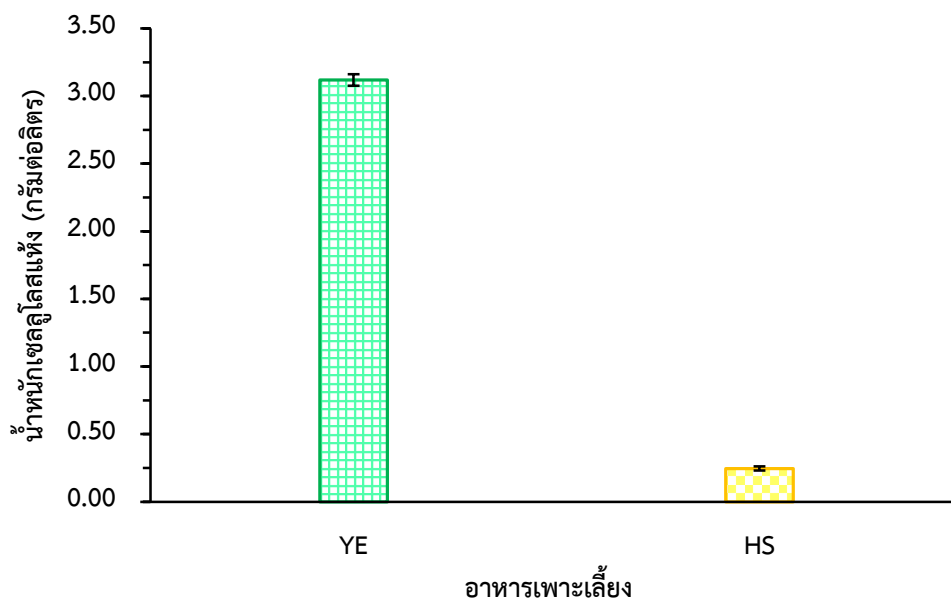
4.3 การจัดจำแนกจุลินทรีย์โดย 16s rDNA

การจำแนกจุลินทรีย์วิเคราะห์ ณ. ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) จำแนกโดยการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์อนุกรมของยีน 16S rDNA พบว่า สามารถจำแนกได้เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Komagataeibacter nataicola* (*K. nataicola*) หรือเรียกว่า *Gluconacetobacter nataicola* (*G. nataicol*) โดยมีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 100.00 จากการศึกษาของ Lisdiyanti *et al.* (2006) พบว่า *K. nataicola* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) มีรูปร่างเป็นแท่ง มีขนาดประมาณ $0.5-0.8 \times 1.0-1.5$ นาโนเมตร อยู่แบบเดี่ยวหรือแบบคู่ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคตาเลส สามารถผลิตเซลลูโลสได้ สามารถออกซิไดซ์แอสซิเตตและแลคเตตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ผลิตกรดกรดแอสติคจากเอทานอลได้ เจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยง AG (955. AG MEDIUM) ที่มีความเข้มข้นของกรดกรดแอสติกร้อยละ 0.35 แต่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยง AE (849. AE MEDIUM) ที่มีความเข้มข้นของกรดกรดแอสติคสูงร้อยละ 1-5 สามารถผลิตกรดได้จากน้ำตาลแอล-อะราบินอส (L-arabinose), ดี-ไรโบส (D-ribose), ดี-ไซโรส (D-xylose), ดี-กาแล็กโทส (D-galactose), ดี-กลูโคส (D-glucose), เอทานอล (ethanol), เอ็น-บิวทานอล (1-Butanol) และเซค-บิวทานอล (2-Butanol) แต่ไม่สามารถผลิตกรดได้จากน้ำตาลดี-ฟรุคโทส (D-fructose)

4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดย *K. nataicola*

4.4.1 การศึกษาชนิดของอาหารต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดย *K. nataicola*

นำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.79 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง HS และ YE ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พิเอชเท่ากับ 5 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) จากนั้นนำแผ่นแบคทีเรียเซลลูโลสมาวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง พบว่า *K. nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง YE ได้สูงกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง HS ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลส เท่ากับ 3.119 ± 0.0436 และ 0.246 ± 0.0156 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 8 หรือคิดเป็น 13 เท่า เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง YE และ HS มีความแตกต่างกัน โดยในอาหารเพาะเลี้ยง YE มีการเติม ammonium sulphate ((NH₄)₂SO₄) 5 กรัมต่อลิตร magnesium sulfate heptahydrate (MgSO₄•7H₂O) 4.1 กรัมต่อลิตร และ potassium dihydrogen orthophosphate (KH₂PO₄) 3 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสมากกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง HS จากการศึกษาการเพาะเลี้ยง *Gluconacetobacter xylinus* โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยง HS (Hestrin and Schramm, 1954) และอาหารเพาะเลี้ยง YE (Yamanaka and Watanabe, 1994) ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกัน พบว่า *Gluconacetobacter xylinus* สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง YE ได้มากกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง HS ได้น้ำหนักแห้งเท่ากับ 7.34 และ 1.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Masaoka *et al.* (1993) พบว่า *Acetobacter xylinum* สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงในอาหารเพาะเลี้ยง HS ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสเท่ากับ 10.8 กรัมต่อลิตร เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีกระบวนการเมแทบอลิซึมที่แตกต่างกัน องค์ประกอบของอาหารจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส (Jedrzejczak-Krzepkowska *et al.*, 2016) ดังนั้น จึงเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยง YE มาศึกษาการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดยใช้น้ำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน แทนการเติมน้ำตาลกลูโคส โดยใช้น้ำข้าวข้าวที่ไม่ผ่านกระบวนการปรับสภาพเพื่อเป็นการลดต้นทุนในกระบวนการผลิต ทั้งในด้านสารเคมีและพลังงาน อีกทั้งยังประหยัดเวลาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย



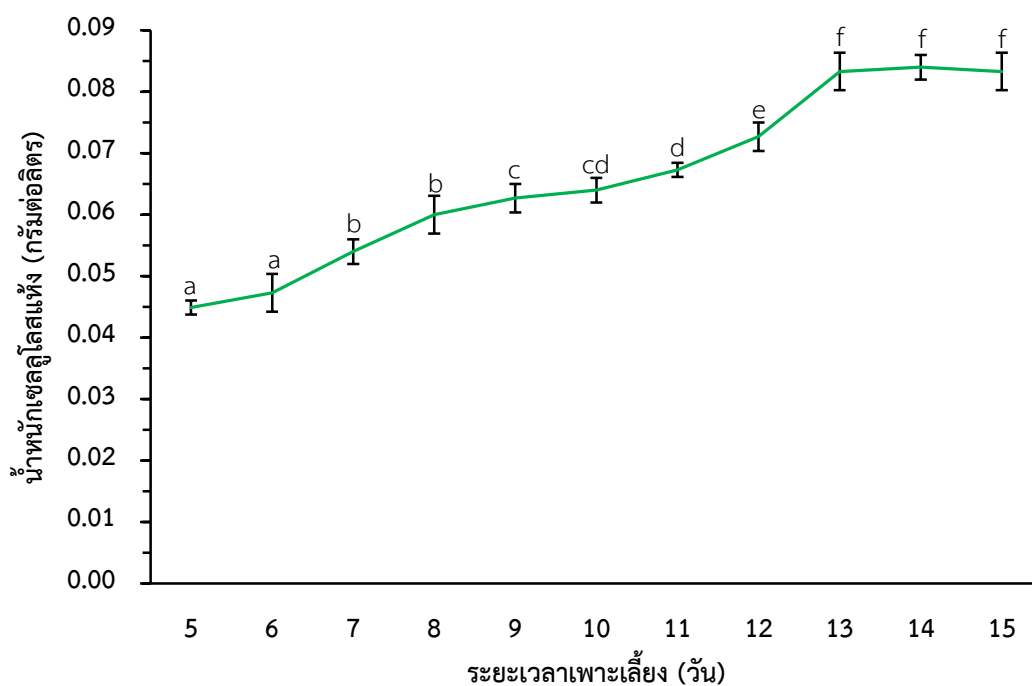
ภาพที่ 8 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดย *K. Nataicola* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

4.4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดย *K. nataicola* ในอาหาร water from washing rice medium (WWR)

4.4.2.1 ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง

นำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.80 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง WWR ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4.0 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง พบว่า *K. nataicola* เริ่มมีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสตั้งแต่วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสในวันที่ 4 ไม่ได้แสดงในภาพที่ 9) และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 4-13 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นเริ่มคงที่ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสในวันที่ 13, 14 และ 15 เท่ากับ 0.083 ± 0.0031 , 0.084 ± 0.0020 และ 0.083 ± 0.0031 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 9 จากการศึกษาเชื้อในสกุลเดียวกัน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Sheykhazari *et al.* (2011) ที่รายงานว่า *Gluconacetobacter xylinus* มีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสเพิ่มขึ้นตามเวลาของการเพาะเลี้ยง และไม่มีการผลิตเพิ่มมากขึ้น หลังจากวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง Pedro Carreira *et al.* (2011) พบว่า *Gluconacetobacter swingsii* สามารถผลิตแบคทีเรีย

เซลล์ูโลสได้สูงสุดในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง โดยใช้แมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน และ Hungund (2013) พบว่า *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูโลสได้สูงสุดในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้น จึงเลือกระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 13 วัน ใช้ในการศึกษาต่อไป

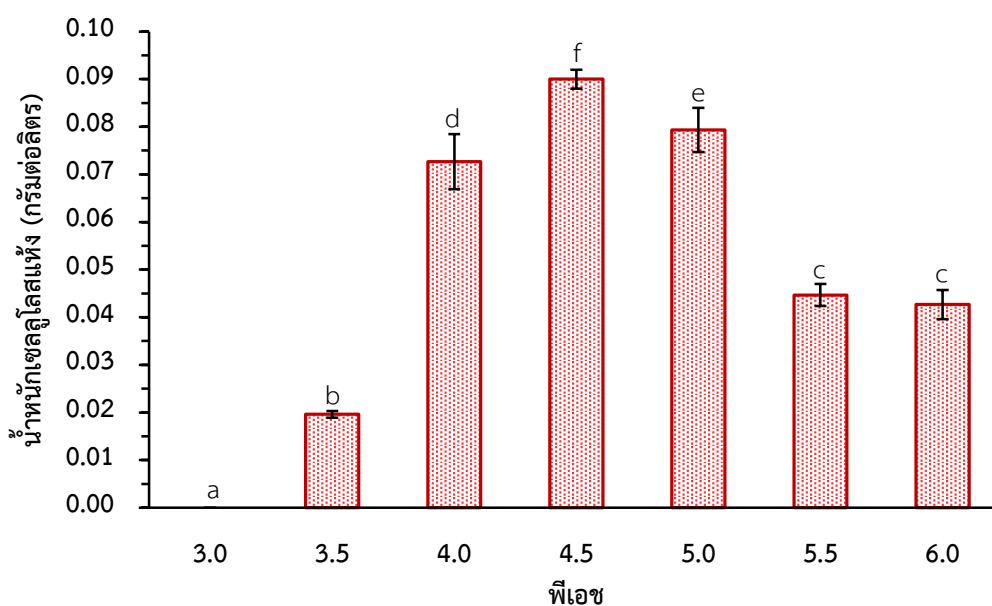


ภาพที่ 9 ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูโลสโดย *K. Nataicola* ในอาหาร WWR ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

4.4.2.2 พีเอช

นำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.79 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง WWR ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4.0 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง พบว่า *K. nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูโลสได้สูงที่พีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียลเซลล์ูโลสเท่ากับ 0.090 ± 0.0020 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน และที่พีเอช 4.0 และ 5.0 มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.073 ± 0.0058 และ 0.079 ± 0.0046 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน ตามลำดับ

และที่พีเอชเท่ากับ 3.0 พบว่า *K. nataicola* ไม่มีการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส แสดงดังภาพที่ 10 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Hwang *et al.* (1999) ที่รายงานว่ พีเอชของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสคือ 4.5 และไม่มีการแบคทีเรียลเซลลูโลสเมื่อพีเอชต่ำกว่า 3.5 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Masaoka *et al.* (1993) ที่รายงานว่ ค่าพีเอชของอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสอยู่ในช่วง 4.0-6.0 แต่หากค่าพีเอชของอาหารลดลงต่ำกว่า 4 ส่งผลให้การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสลดลง เนื่องจากค่าพีเอชส่งผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ และการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมัก (Ohara *et al.*, 1992) และยังผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารอาหาร (Andreyeva and Biryukov, 1973) รวมถึงการยอมให้สารอาหารผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ได้ นอกจากนี้ Masaoka *et al.* (1993) พบว่า ในระหว่างกระบวนการหมักแบบนิ่ง ส่งผลให้พีเอชของอาหารลดลง เนื่องจากเมแทบอลิซึมการหายใจของ *Gluconacetobacter xylinus* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการออกซิเดชันเอทานอลไปเป็นกรดแอซีติก (acetic acid) และการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิก (gluconic acid) เพราะฉะนั้น การควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเซลล์และการผลิตเซลลูโลสจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง (Kongruang, 2008) ดังนั้น จึงเลือกพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4.5 ใช้ในการศึกษาต่อไป

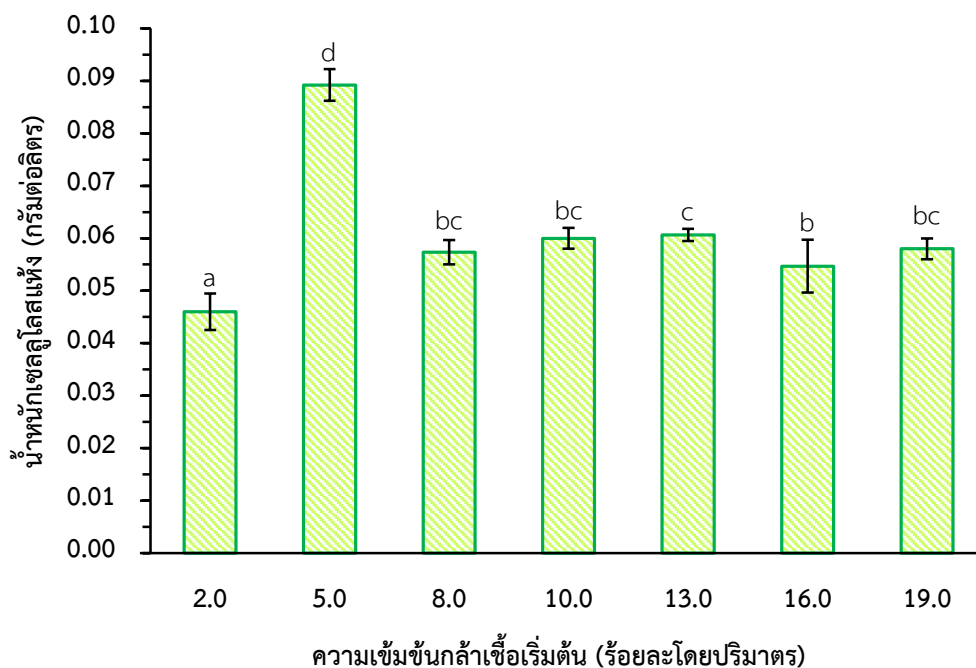


ภาพที่ 10 พีเอชต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย *K. Nataicola* ในอาหาร WWR ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

4.4.2.3 ความเข้มข้นกล้าเชื้อ

นำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.80 ปริมาตร 2, 5, 8, 10, 13 และ 19 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ถ่ายลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง WWR ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4.0 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง พบว่า *K. Nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้สูงสุด ที่ความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียลเซลลูโลสเท่ากับ 0.089 ± 0.0030 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน แสดงดังภาพที่ 12 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 8.0, 10.0, 13.0 และ 19.0 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร พบว่า มีการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสน้อยกว่าที่ความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร แสดงดังภาพที่ 11 เนื่องจากความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้นมากส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียมีมากเกินไป ซึ่งภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารอยู่อย่างจำกัด ทำให้เกิดภาวะการแข่งขัน โดยในภาวะนี้แบคทีเรียไม่มีการสร้างสารทุกชนิด จึงมีการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสลดลง (Alaban, 1962) เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์กล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 2.0 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร พบว่า *K. Nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้ต่ำ ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียลเซลลูโลสเท่ากับ 0.046 ± 0.0035 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน แสดงดังภาพที่ 11 ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ใช้ในการศึกษาต่อไป



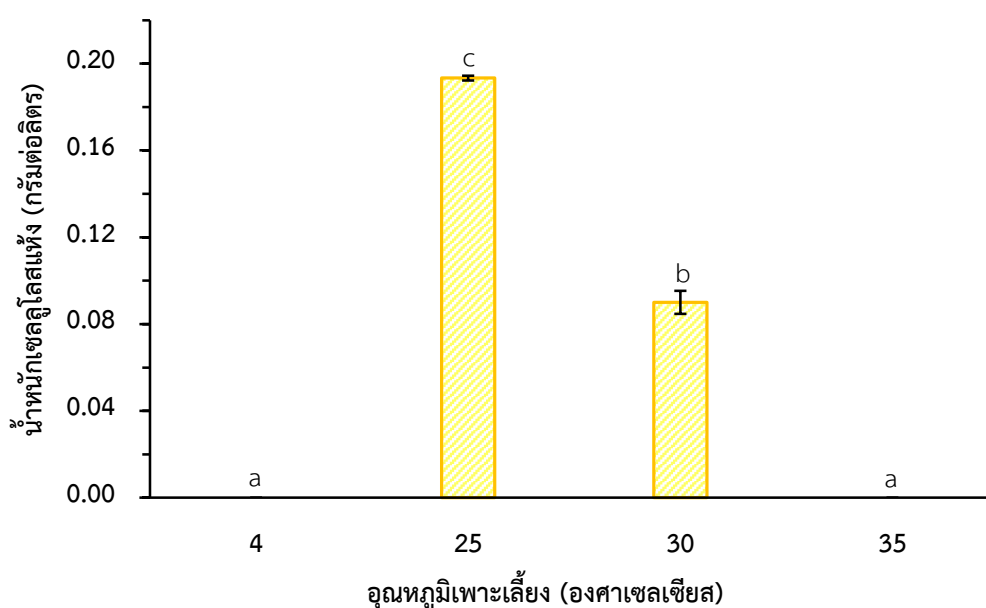


ภาพที่ 11 ความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดย *K. Nataicola* ในอาหาร WWR พีเอชเท่ากับ 4.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

4.4.2.4 อุณหภูมิเพาะเลี้ยง

นำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.81 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง WWR ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4.0 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4, 25, 30, 35 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง พบว่า *K. Nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสเท่ากับ 0.193 ± 0.0012 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน ในขณะที่สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้ต่ำที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้น้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.090 ± 0.0052 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน เมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิ 4, 35 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่พบการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส แสดงดังภาพที่ 12 อุณหภูมิถือเป็นตัวแปรที่สำคัญซึ่งมีผลกระทบต่อทั้งการเจริญของแบคทีเรีย และการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส จากการศึกษาของ Gromet-Elhanan and Hestrin (1963); Hestrin and Schramm (1954) พบว่า อุณหภูมิในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส

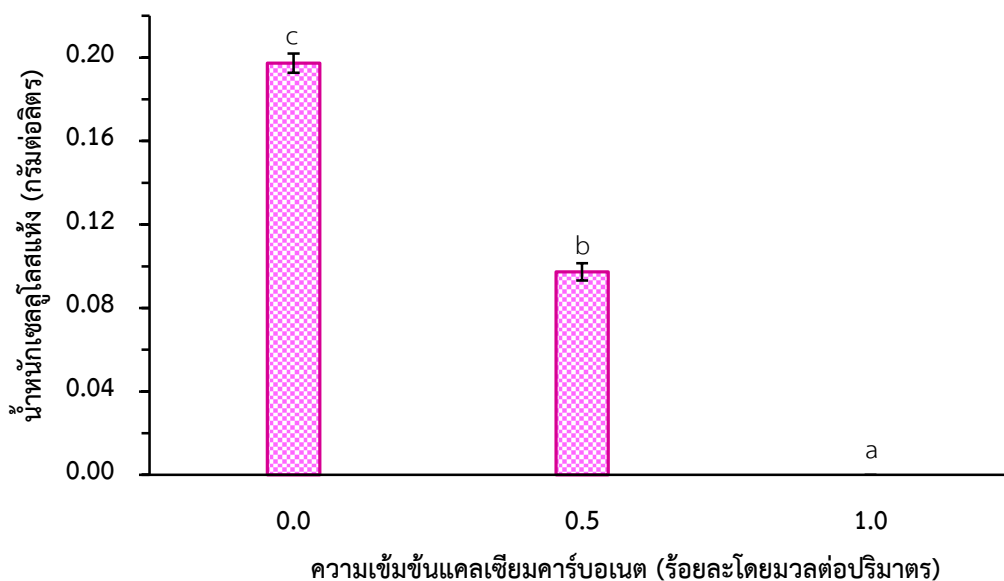
สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้สูงสุด Alaban (1962) ศึกษากระบวนการหมัก *Acetobacter* sp. ในอาหารน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิในช่วง 10-45 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญได้ แต่ไม่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส ซึ่งการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ถึง 28-32 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เกิดผลเสียต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ การเสถียรภาพของโปรตีน โครงสร้างของแฟลกเจลลา ไรบิโอซิม โปรโตพลาส และไมโทคอนเดรีย (Kováč and Subík, 1970) ดังนั้นจึง เลือกของอุณหภูมิจึงเพาะเลี้ยง 25 องศาเซลเซียส ใช้ในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 12 อุณหภูมิเพาะเลี้ยงต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย *K. Nataicola* ในอาหาร WWR พีเอชเท่ากับ 4.5 ความเข้มข้นกล้ำเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรเป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

4.4.2.5 ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต

นำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.79 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง WWR ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4.0 กรัมต่อลิตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, และ 4.0 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร และปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง พบว่า *K. Nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้สูงในอาหารที่ไม่มีเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียลเซลลูโลสเท่ากับ 0.197 ± 0.0046 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน และที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร มีการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส ลดลงเหลือเพียง 0.097 ± 0.0042 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน และที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคาร์บอเนตสูงขึ้น ไม่พบการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส แสดงดังภาพที่ 13 ผลการทดลองนี้ตรงกันข้ามกับการศึกษาของ Tanskul *et al.* (2013) ที่รายงานว่า *Rhodococcus* sp. MI 2 มีการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ Hong and Qiu (2008) พบว่า *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* มีการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1 มิลลิโมลต่อลิตร ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการเพิ่มขึ้นเมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง เป็นผลมาจากแคลเซียมไอออนไปยับยั้งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ลดการสังเคราะห์เซลลูโลส (cellulose synthase) บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของ *A. xylinum* ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์เซลลูโลสเพิ่มขึ้น (Aloni *et al.*, 1983; Peter Ross *et al.*, 1985) ซึ่งเป็นกลไกที่ซับซ้อน และเกิดขึ้นกับแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น (Welfle *et al.*, 2008)

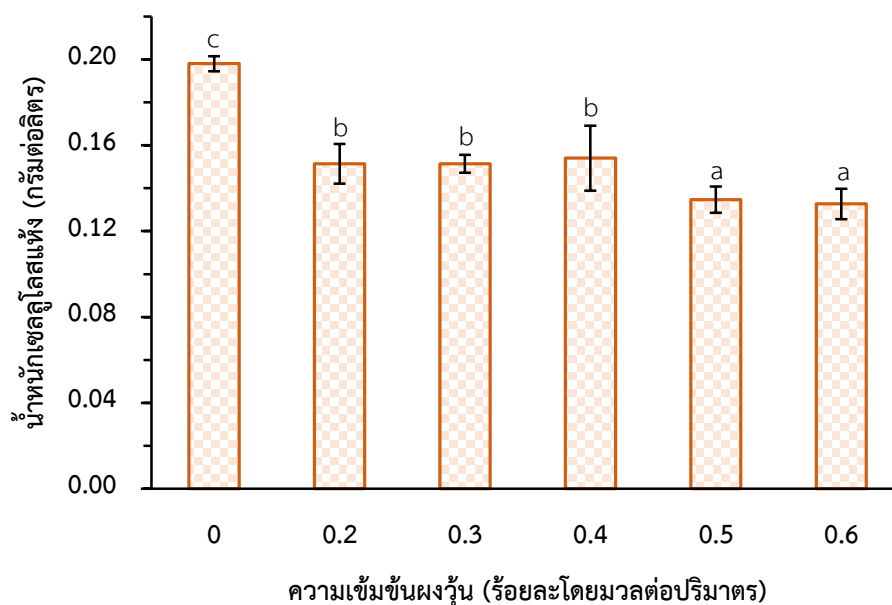


ภาพที่ 13 ความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดย *K. Nataicola* ในอาหาร WWR พีเอชเท่ากับ 4.5 กล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

4.4.2.6 เข้มข้นของผงวุ้น

นำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.79 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง WWR ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4.0 กรัมต่อลิตร และเติมผงวุ้นที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร และปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 จากนั้นนำไปปฏุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง พบว่า *K. Nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงในอาหารที่ไม่มีการเติมผงวุ้น ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสเท่ากับ 0.198 ± 0.0035 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน และพบว่าในอาหารที่มีการเติมผงวุ้นมีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสน้อยกว่าในอาหารที่ไม่มีการเติมผงวุ้น แสดงดังภาพที่ 14 ผลการทดลองนี้ตรงกันข้ามกับการศึกษาของ Bae *et al.* (2004) ที่รายงานว่า การเติมผงวุ้นลงในอาหารส่งผลให้มีการผลิตเซลลูโลสของ *A. xylinum* BPR 2001 เพิ่มขึ้น ในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวนแบบ 2 ใบพัด เนื่องจากความหนืดของอาหารช่วยให้แบคทีเรียเซลลูโลสเกิดการกระจายและป้องกันไม่ให้แบคทีเรียเซลลูโลส

รวมตัวกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ ดังนั้น ก้อนแบคทีเรียลเซลล์ขนาดเล็กจึงเป็นประโยชน์ในแง่ของการถ่ายโอนสารอาหาร และออกซิเจนเข้าไปสู่เซลล์แบคทีเรียที่อยู่ภายใน และบนพื้นผิวของแบคทีเรียลเซลล์ ส่งผลให้แบคทีเรียเจริญได้เต็มที่ และสามารถผลิตแบคทีเรียลเซลล์ได้สูงกว่าอาหารที่ไม่มีการเติมผงวุ้น (Bae *et al.*, 2004) แต่การศึกษาในครั้งนี้ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบนี้ จึงอาจเป็นไปได้ว่าความหนืดของอาหารเพาะเลี้ยงไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ และการผลิตเซลล์ของ *K. Nataicola*

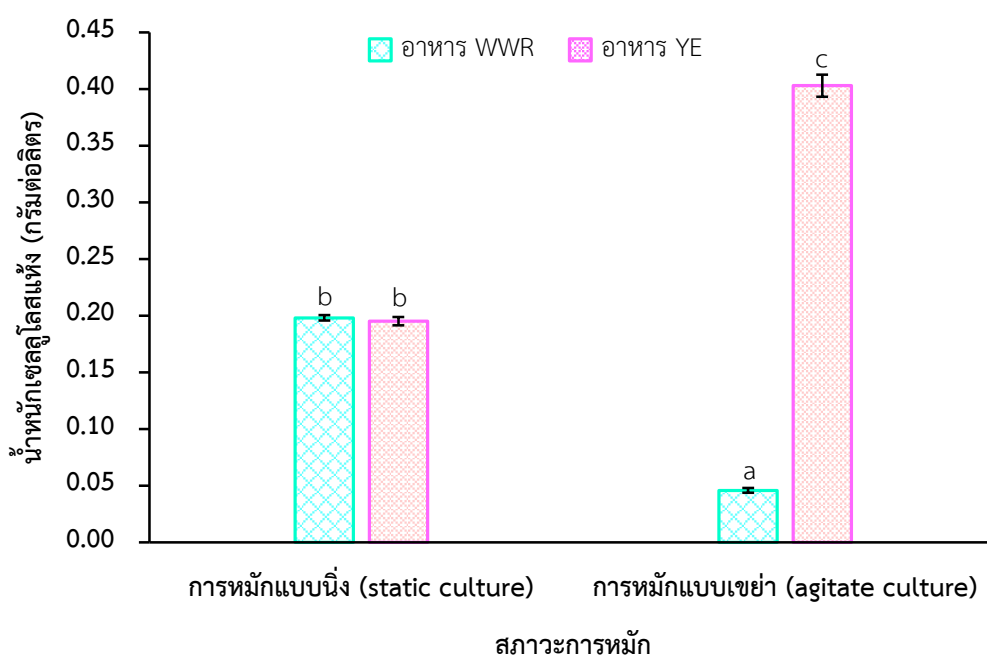


ภาพที่ 14 ความเข้มข้นผงวุ้นต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลล์โดย *K. Nataicola* ในอาหาร WWR พีเอชเท่ากับ 4.5 กล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนี้ รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

4.4.3 การศึกษาวิธีผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดย *K. nataicol* ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) และแบบเขย่า (agitate culture)

นำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.80 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง YE และ WWR ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่งและแบบเขย่า พบว่า *K. Nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงในอาหารเพาะเลี้ยง YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสเท่ากับ 0.403 ± 0.0097 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน แสดงดังภาพที่ 15 ลักษณะของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้ มีการจับกันเป็นก้อนวงรี และจมอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง แสดงดังภาพที่ 19a และ 19b ซึ่งในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า พบว่ามีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้น้อยกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง YE ประมาณ 8 เท่า ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสเท่ากับ 0.046 ± 0.0022 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน แสดงดังภาพที่ 15 ลักษณะของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้ มีการกระจายเป็นเส้นใย ไม่จับตัวกันเป็นก้อน และจมอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง แสดงดังภาพที่ 18a และ 18b เมื่อพิจารณาการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบนิ่งของอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE พบว่ามีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสไม่แตกต่างกัน โดยมีน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสเท่ากับ 0.198 ± 0.0023 และ 0.195 ± 0.0037 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 15 และลักษณะของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้ มีลักษณะเป็นแผ่นลอยอยู่บนผิวหน้าของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการสัมผัสกับอากาศ แสดงดังภาพที่ 16a, 16b, 17a และ 17b จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *K. Nataicola* สามารถใช้น้ำข้าวข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้ และมีน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสไม่แตกต่างกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง อีกทั้งยังมีน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสมากกว่าการทดลองของ Carreira *et al.* (2011) ที่รายงานว่า *Gluconacetobacter sacchari* สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดยใช้ชีสเวย์ (cheese whey) และกลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีน้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสทั้งสองสูตรอาหารเท่ากับ 0.10 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสมากกว่าการทดลองของ Sunagawa *et al.* (2012) ที่รายงานว่า *Gluconacetobacter xylinus* สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส โดยใช้ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นแหล่งคาร์บอน ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสเท่ากับ 0.18 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 9 และเมื่อนำแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้ในทุกสภาวะมากำจัดเซลล์ และอาหารเพาะเลี้ยงที่ติดอยู่ในแบคทีเรียเซลลูโลสออก โดยนำไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น พบว่า

สีของแบคทีเรียเซลลูโลสที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบเขย่าในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และสีของแบคทีเรียเซลลูโลสที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบเขย่าในอาหาร WWR และ YE แบคทีเรียเซลลูโลสมีสีขาวและใสขึ้น เมื่อเทียบกับก่อนนำไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และล้างด้วยน้ำ แสดงดังภาพที่ 16c, 17c และ 18c เมื่อพิจารณาสีของแบคทีเรียเซลลูโลสที่เพาะเลี้ยงแบบเขย่าในอาหาร YE พบว่าแบคทีเรียเซลลูโลสมีสีที่ไม่แตกต่างกันมาก เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนนำไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และล้างด้วยน้ำ ซึ่งยังคงปรากฏสีเหลืองให้เห็นอยู่ แสดงดังภาพที่ 19c เนื่องจากแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้มีความหนาแน่นสูง ส่งผลให้สามารถกำจัดเซลล์และอาหารเพาะเลี้ยงที่ติดอยู่ในแบคทีเรียเซลลูโลสออกได้เพียงบางส่วน และเมื่อนำแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้ในทุกสภาวะมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เป็นเวลา 2 วัน พบว่าแบคทีเรียเซลลูโลสแห้งสนิท มีสีขาวและขุ่นขึ้น แสดงดังภาพที่ 16d, 17d, 18d และ 19d



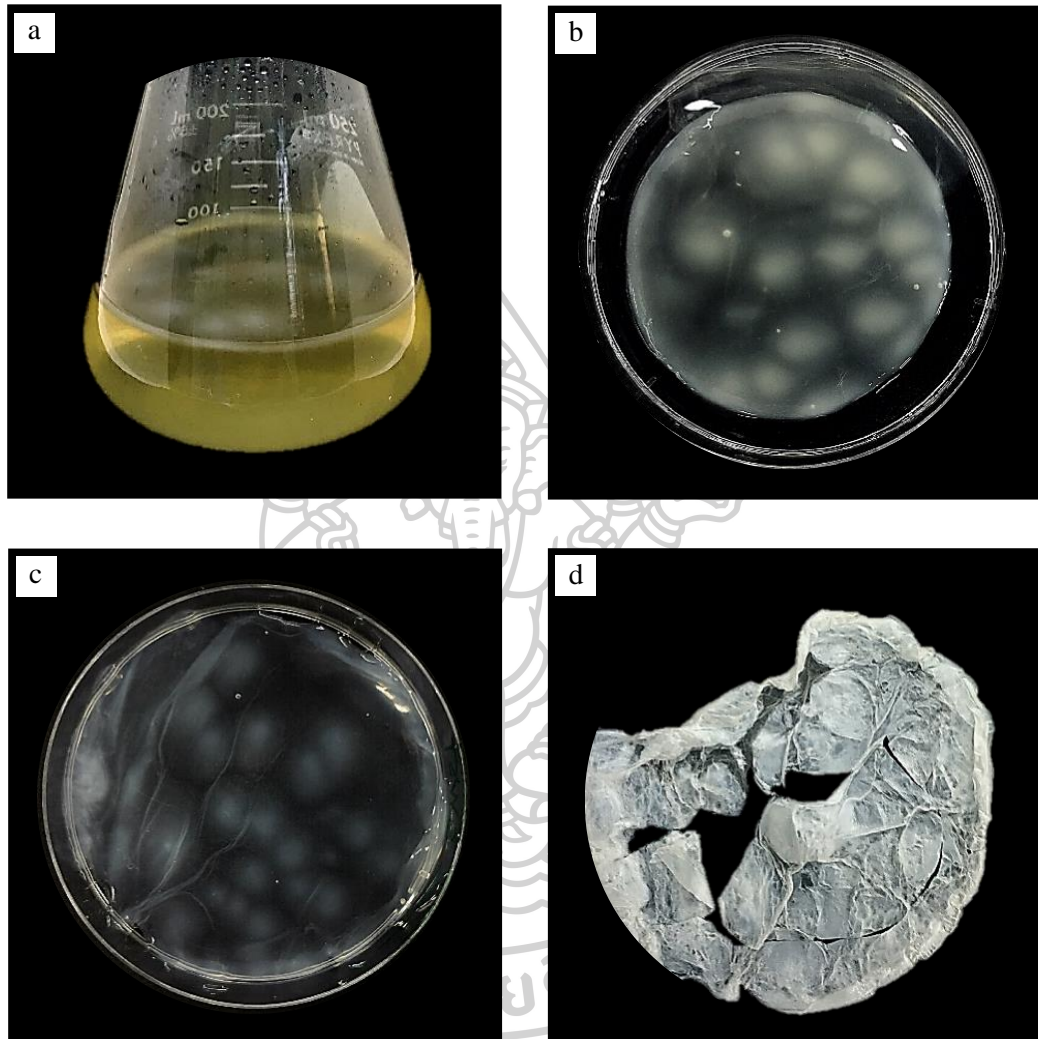
ภาพที่ 15 การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดย *K. nataicol* ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และแบบเขย่าในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE พิเศษเท่ากับ 4.5 ความเข้มข้นกล้ำเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

ตารางที่ 9 การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจาก *K. nataicola* โดยใช้ข้าวขาว เทียบกับเชื้อและแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

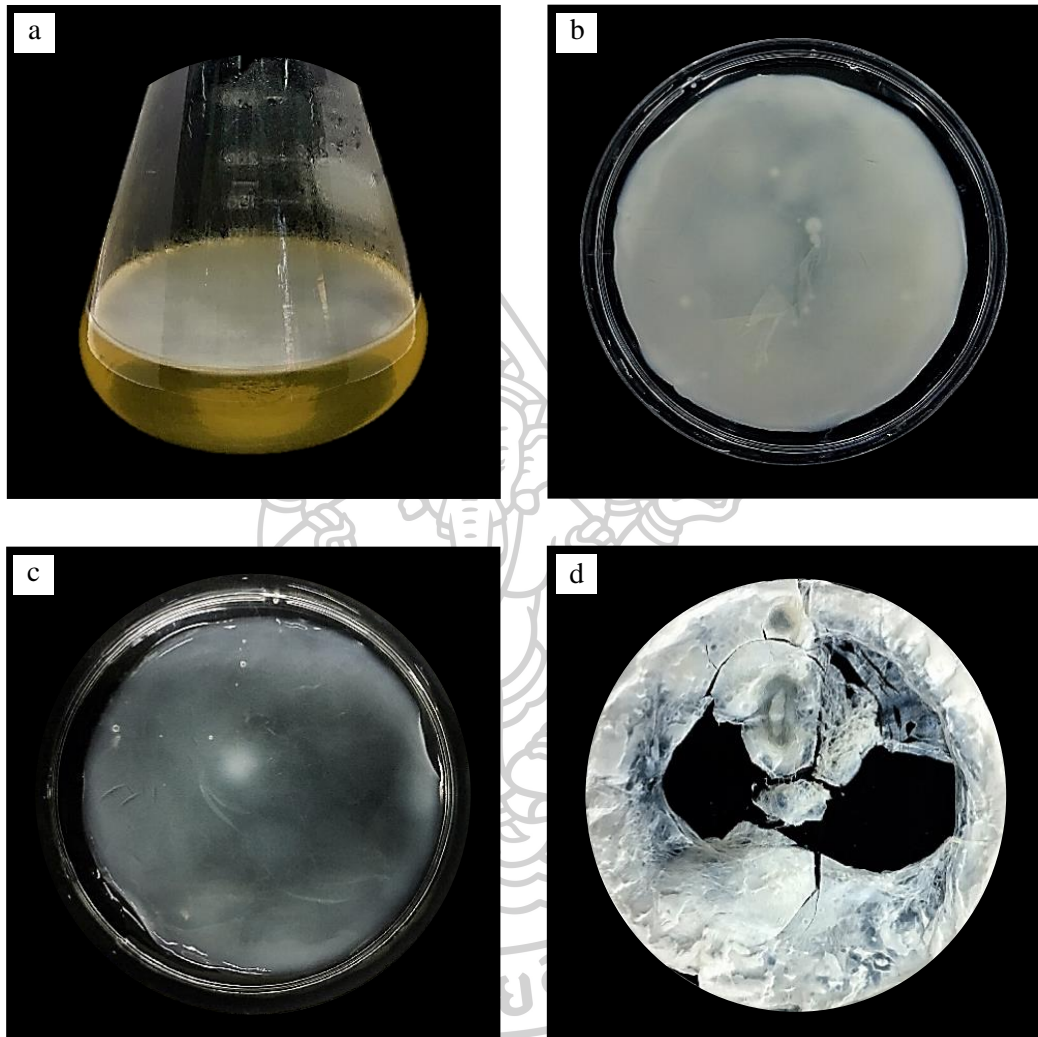
จุดินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	องค์ประกอบ		ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (กรัมต่อลิตร)	ผลได้	อ้างอิง
		เพิ่มเติม				
<i>Acetobacter acetii</i> AJ 12368	ซูโครส	ไม่มี	6 วัน	1.07	Okiyama et al. (1992)	
<i>Acetobacter</i> sp. A9	กลูโคส	เอทานอล	8 วัน	15.20	Son et al. (2001)	
<i>Acetobacter</i> sp. V6	กลูโคส	เอทานอล	8 วัน	4.16	Son et al. (2003)	
<i>Acetobacter xylinum</i> BPR2001	กากน้ำตาล	ไม่มี	3 วัน	7.82	Bae et al. (2004)	
<i>Acetobacter xylinum</i> BRC 5	กลูโคส	เอทานอลและออกซิเจน	50 ชั่วโมง	15.30	Hwang et al. (1999)	
<i>Acetobacter xylinum</i> E25	กลูโคส	ไม่มี	7 วัน	3.50	Krystynowicz et al. (2002)	
<i>Acetobacter xylinum</i> NUST4.1	กลูโคส	โซเดียมเอ็ดจินเต	5 วัน	6.00	Zhou et al. (2007)	
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23769	ไบโอดีเซล	ไม่มี	3 วัน	0.18	Sunagawa et al. (2012)	
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> IFO 13773	กลูโคส	ลิโกลูโคสโพแทช	7 วัน	10.10	Keshk and Sameshima (2006)	
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> strain (K3)	แมนนิทอล	ซาเจียว	7 วัน	3.34	Nguyen et al. (2008)	
<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	กลีเซอรอลดิบ	ไม่มี	14 วัน	0.10	Carreira et al. (2011)	
<i>Gluconacetobacter</i> sp. RKY5	กลีเซอรอล	ไม่มี	6 วัน	5.63	Kim et al. (2006)	
<i>Komagataeibacter nataicola</i>	น้ำข้าวขาว	ไม่มี	13 วัน	0.20	งานวิจัยนี้ (ST)	
<i>Komagataeibacter nataicola</i>	น้ำข้าวขาว	ไม่มี	13 วัน	0.05	งานวิจัยนี้ (AT)	

ST คือ การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบนิ่ง

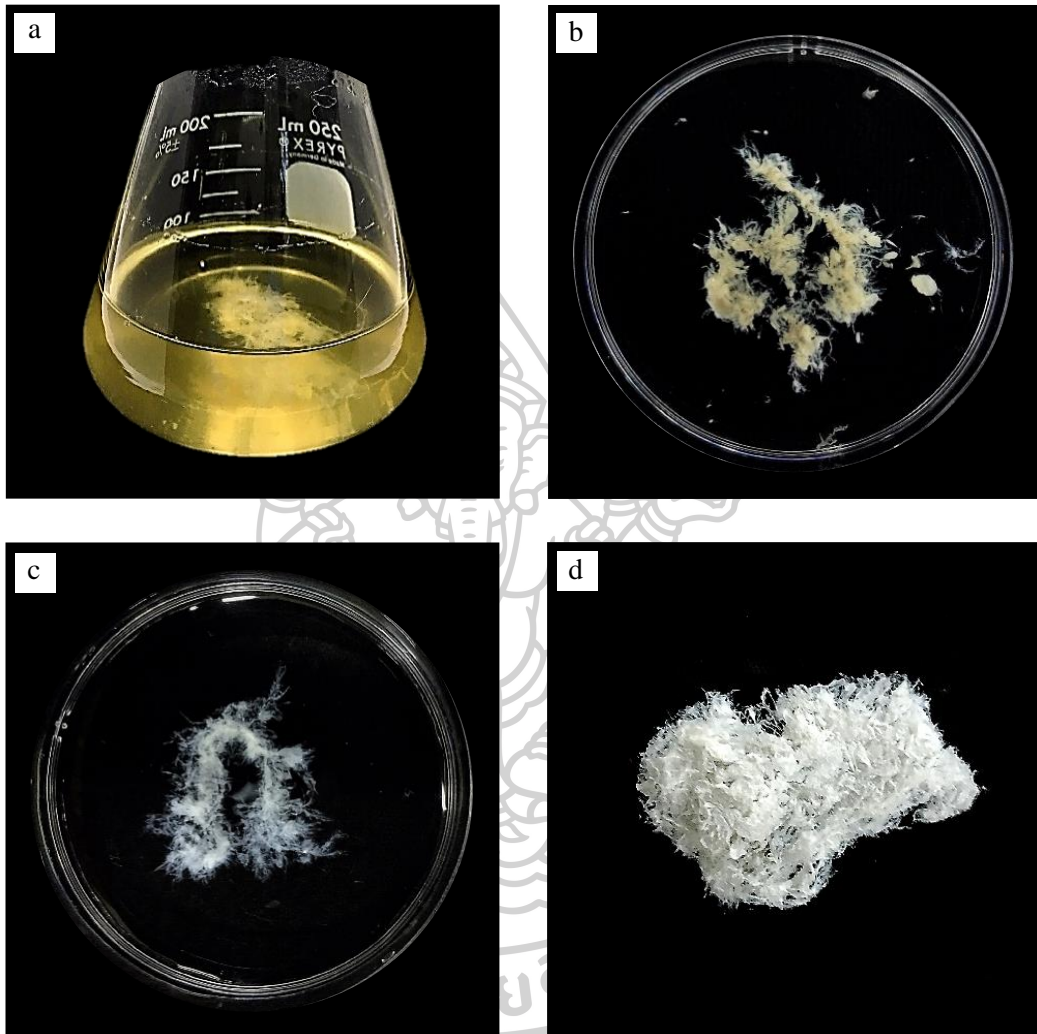
AT คือ การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบเขย่า



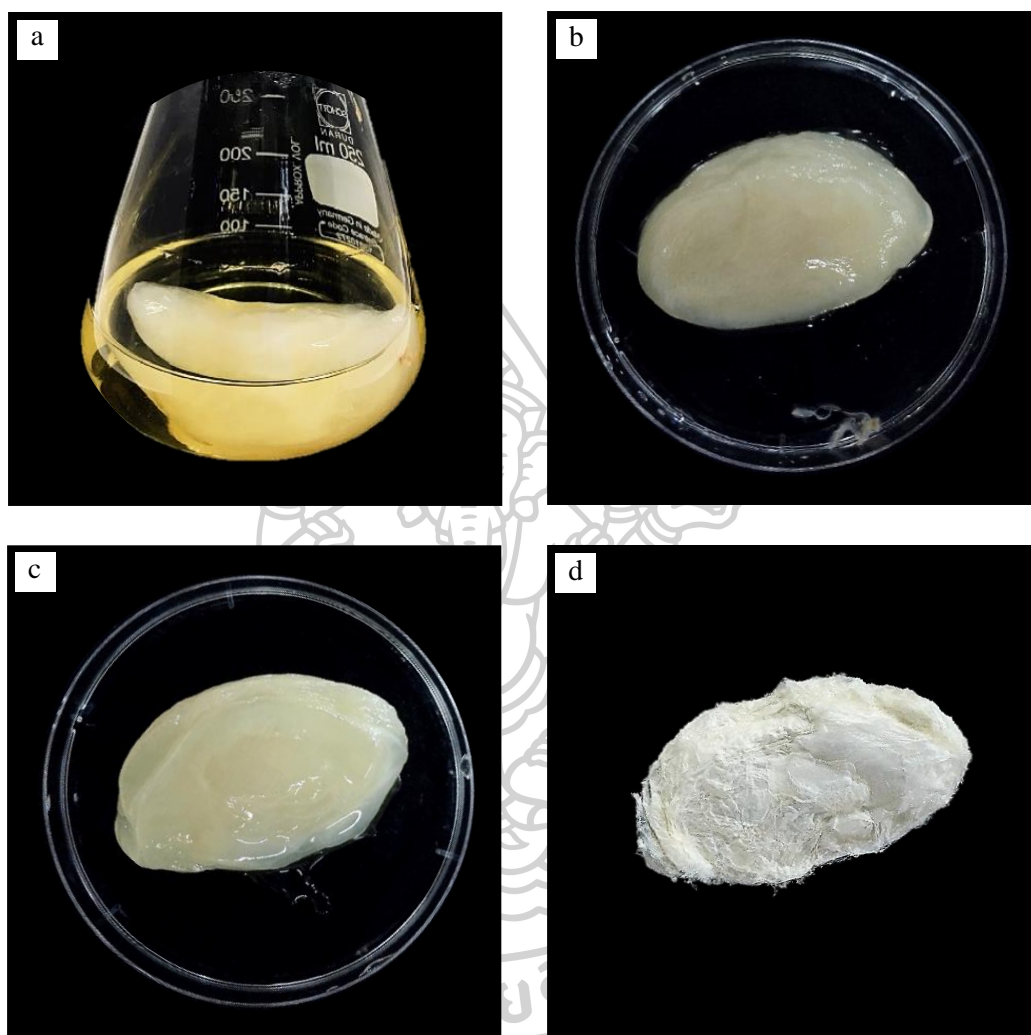
ภาพที่ 16 แบริลที่เรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหาร WWR ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (a และ b), แบริลที่เรียลเซลลูโลสที่ผ่านการต้มด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (c) และแบริลที่เรียลเซลลูโลสที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เป็นเวลา 2 วัน (d)



ภาพที่ 17 แบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหาร YE ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบนี้ (a และ b), แบคทีเรียเซลลูโลสที่ผ่านการต้มด้วยไฮโดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (c) และ แบคทีเรียเซลลูโลสที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เป็นเวลา 2 วัน (d)



ภาพที่ 18 แบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหาร WWR ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบ
เขย่า (a และ b), แบคทีเรียเซลลูโลสที่ผ่านการต้มด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น
0.1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (c) และ แบคทีเรีย
เซลลูโลสที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เป็นเวลา 2 วัน (d)

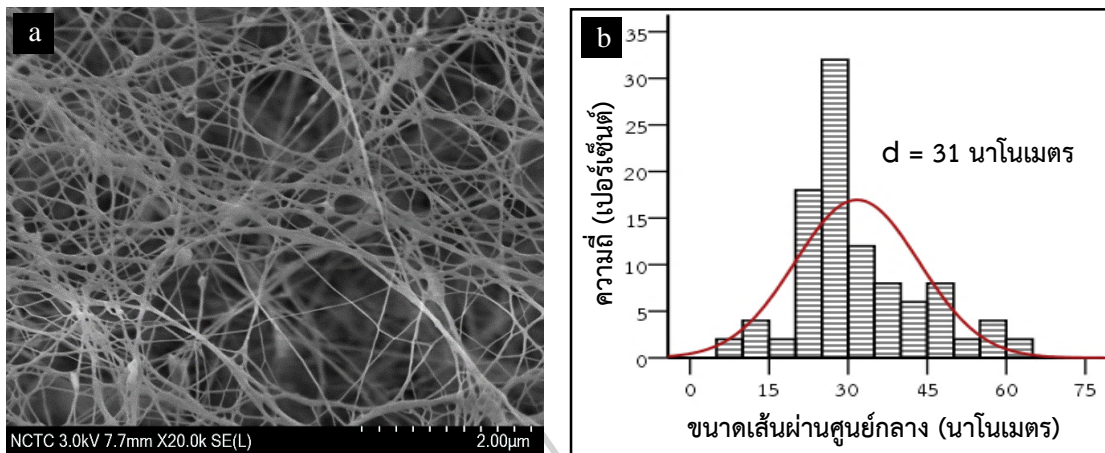


ภาพที่ 19 แบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหาร YE ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบเขย่า (a และ b), แบคทีเรียเซลลูโลสที่ผ่านการต้มด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (c) และ แบคทีเรียเซลลูโลส ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เป็นเวลา 2 วัน (d)

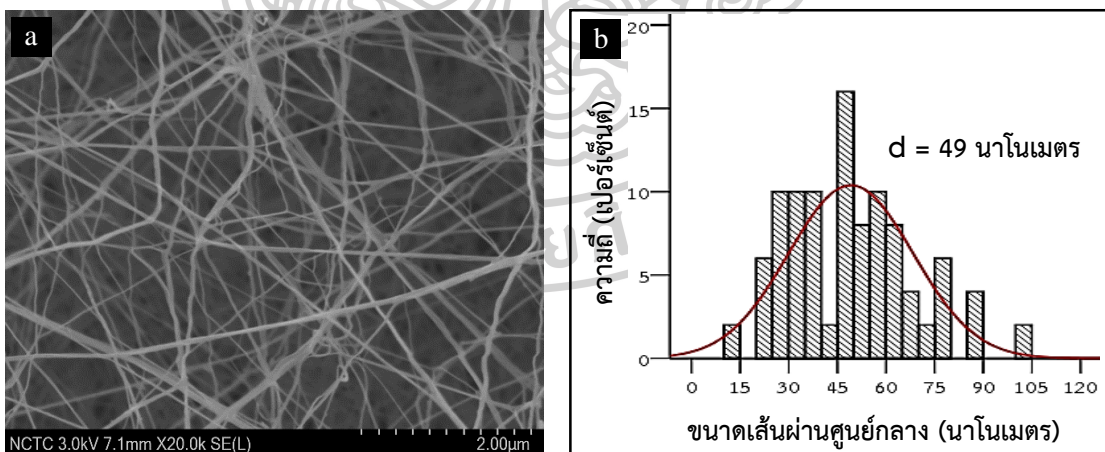
4.4.4 การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลส

4.4.4.1 การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

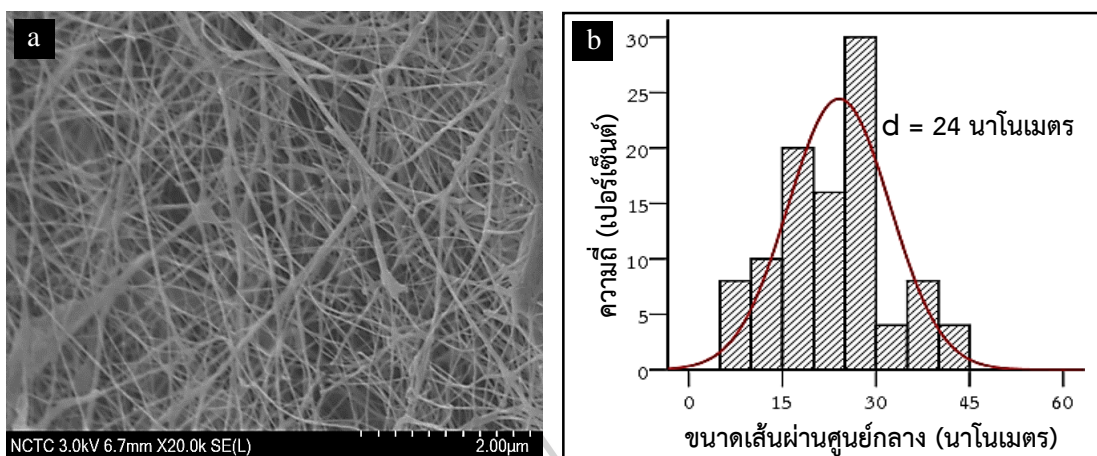
นำแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสผลิตโดย *K. nataicol* ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และแบบเขย่าในอาหาร WWR และ YE มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นวิเคราะห์สัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 20,000 เท่า พบว่าเส้นใยของแบคทีเรียลเซลลูโลสเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบนิ่งในอาหารเพาะเลี้ยง WWR มีความหนาแน่นของเส้นใยมากกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง YE สังเกตได้จากรูพรุนระหว่างเส้นใยน้อย เส้นใยเป็นปมในบางตำแหน่ง แสดงดังภาพที่ 20a และ 21a และเส้นใยของแบคทีเรียลเซลลูโลสเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบเขย่า ในอาหารเพาะเลี้ยง YE มีความหนาแน่นของเส้นใยมากกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง WWR แสดงดังภาพที่ 22a และ 23 การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบเขย่าในอาหารเพาะเลี้ยง YE เส้นใยของแบคทีเรียลเซลลูโลสมีการเรียงชิดติดกัน ไม่เกิดรูพรุนระหว่างเส้นใย ส่งผลให้แบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้มีความแข็งแรง (Huang *et al.*, 2016) การวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางด้วยโปรแกรม ImageJ เวอร์ชัน 1.51J8 โดยสุ่มตัวอย่างของเส้นใยมาจำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบนิ่งในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 31 และ 49 นาโนเมตร ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 20b และ 21b ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบเขย่าในอาหารเพาะเลี้ยง WWR มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 22b เมื่อพิจารณาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบเขย่าในอาหารเพาะเลี้ยง YE ไม่สามารถวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ เนื่องจากเส้นใยเรียงชิดติดกันแน่น แสดงดังภาพที่ 23 จากผลทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสมีขนาดของเส้นใยเล็กกว่าเส้นใยที่มาจากฝ้าย ซึ่งมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-500 ไมโครเมตร (Kim and Triplett, 2001) และจากการศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน พบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย *Komagataeibacter xylinus* ในอาหาร 2 ชนิด คือ HS และ CPPE (CPPE คือ เปลือกและกากส้มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแตกต่างกัน เท่ากับ 60 และ 50 นาโนเมตร ตามลำดับ แม้ว่าเชื้อที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจะเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน แต่เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน จึงส่งผลให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้มีขนาดที่แตกต่างกัน (Fan *et al.*, 2016)



ภาพที่ 20 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหาร WWR ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า (a) และ ผลการวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียเซลลูโลส (b)



ภาพที่ 21 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหาร YE ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า (a) และ ผลการวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียเซลลูโลส (b)



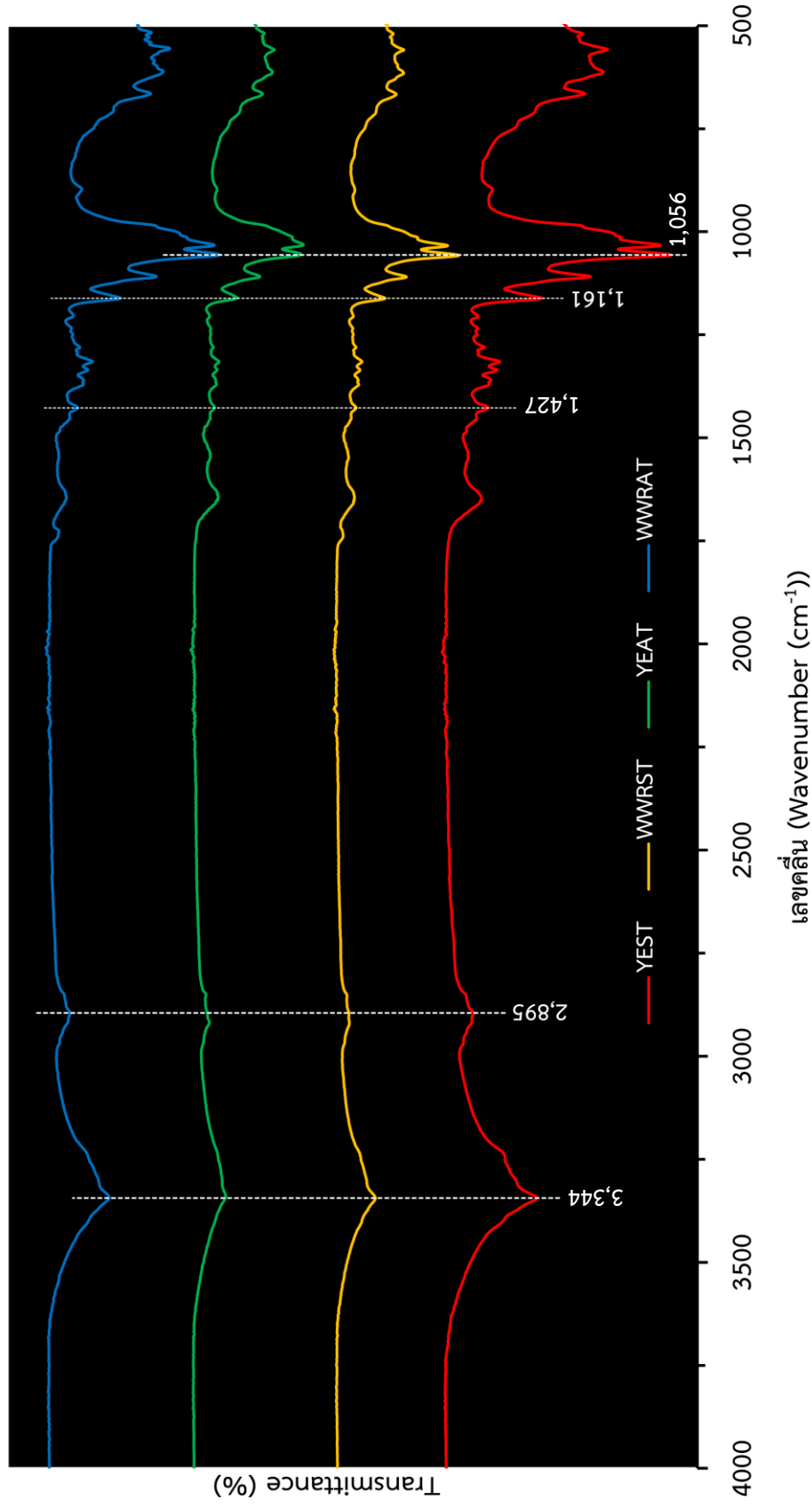
ภาพที่ 22 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหาร WWR ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า (a) และ ผลการวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียเซลลูโลส (b)



ภาพที่ 23 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหาร YE ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า

4.4.4.2 การวิเคราะห์ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FT-IR)

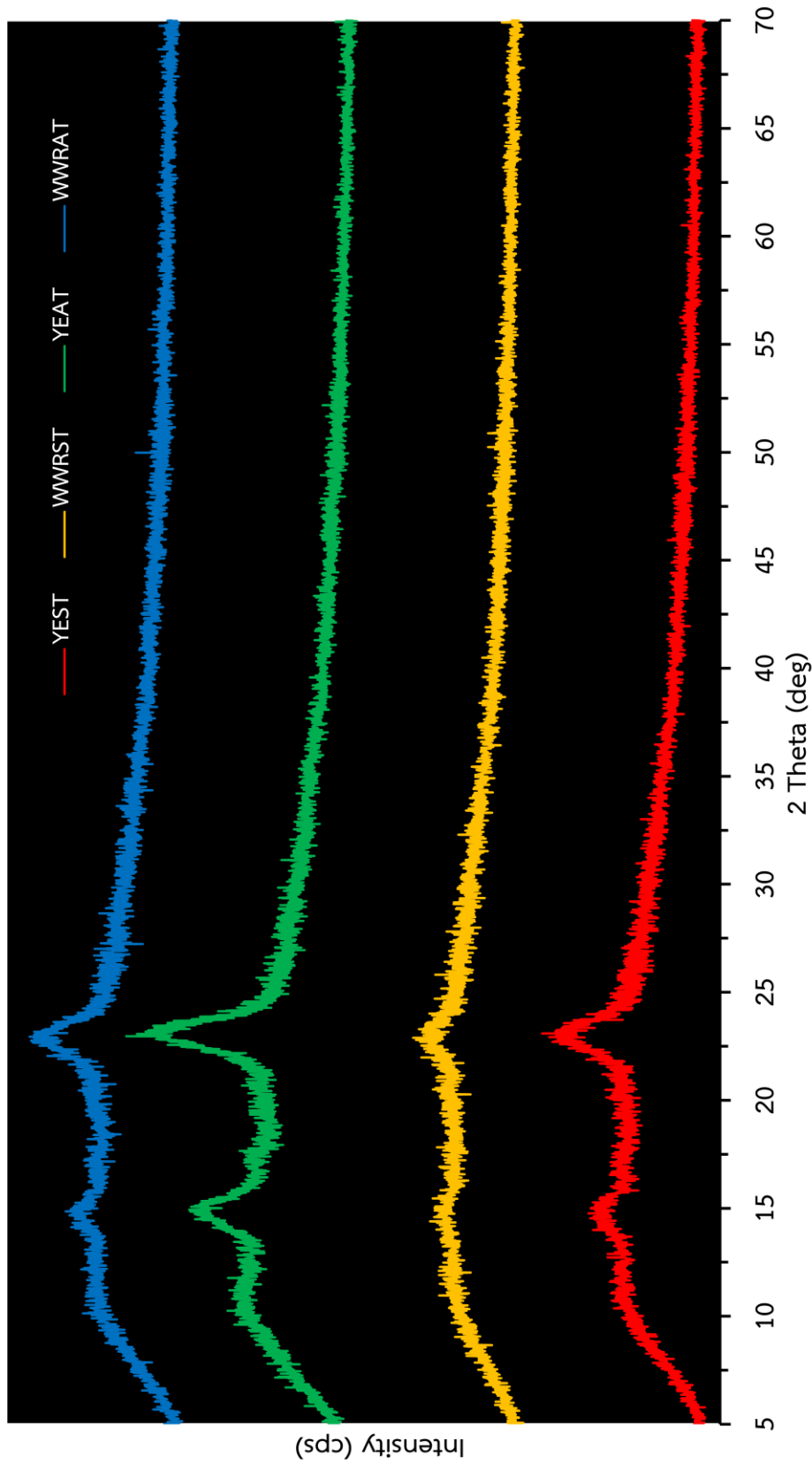
นำแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสผลิตโดย *K. nataicol* ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และแบบเขย่าในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน แสดงดังภาพที่ 24 พบแถบการดูดกลืนในช่วงเลขคลื่น (wavenumber) $3,600-3,000\text{ cm}^{-1}$ มีลักษณะเป็นพีคกว้าง (broad peak) เกิดจากการยืดของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) ของโมเลกุลน้ำตาลกลูโคส ซึ่งซ้อนทับกับแถบการสั่นแบบไม่สมมาตร (asymmetrical stretching) ของหมู่เมทิล (-CH group) จึงปรากฏการดูดกลืนเพียงเล็กน้อย ในช่วงเลขคลื่น $2,900-2,800\text{ cm}^{-1}$ แถบการดูดกลืนที่ตำแหน่งเลขคลื่นประมาณ $1,427\text{ cm}^{-1}$ เกิดการสั่นที่ผิดปกติแบบไม่สมมาตรของเมทิล (-CH₃) และเมทิลีน (-CH₂) แถบการดูดกลืนที่ตำแหน่งเลขคลื่นประมาณ $1,161\text{ cm}^{-1}$ เกิดจากการสั่นแบบไม่สมมาตร (asymmetrical stretching) ของ C-O นอกจากนี้ แถบการดูดกลืนในช่วงเลขคลื่น $1,076-1,023\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเกิดจากการสั่นของพันธะ C-O-C ของ Anhydroglucose พีคที่ปรากฏที่ตำแหน่งเลขคลื่น $1,150\text{ cm}^{-1}$ แสดงถึงพันธะ C-C และพีคที่ปรากฏที่ตำแหน่งเลขคลื่น 903 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบยืดของ C-O-C ของพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ชนิด β -(1,4) ที่ตำแหน่งเลขคลื่น $3,240$ และ 750 cm^{-1} เป็นแถบสัญญาณของผลึกเซลลูโลสชนิด I α และที่ตำแหน่งเลขคลื่น $3,270$ และ 710 cm^{-1} เป็นแถบสัญญาณของผลึกเซลลูโลสชนิด I β ซึ่งทั้ง 2 สัญญาณเป็น Polymorphisms ซึ่งอยู่ในรูปของเซลลูโลส (Barud *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2015) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. nataicol* ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และแบบเขย่าในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE ปรากฏการสั่นของพันธะที่มีความคล้ายกัน ซึ่งพบแถบการดูดกลืนที่ตำแหน่งสำคัญดังนี้ ที่ตำแหน่งเลขคลื่นในช่วง $3,600-3,000\text{ cm}^{-1}$ การดูดกลืนเล็กน้อยในช่วงเลขคลื่น $2,900-2,800\text{ cm}^{-1}$ และการดูดกลืนในช่วงเลขคลื่น $1,076-1,023\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ -OH, -CH และ C-O-C ตามลำดับ ซึ่งเป็นการสั่นของพันธะที่ยืนยันได้ว่าเป็นแถบสัญญาณของแบคทีเรียลเซลลูโลส (Gomes *et al.*, 2013) และจากวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน พบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย *Komagataeibacter xylinus* ในอาหารเพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือ HS และ CPPE (CPPE คือ เปลือกและกากส้มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์) พบแถบการดูดกลืนสำคัญที่ตำแหน่งเลขคลื่นประมาณ 3353 , 2898 , 1163 และ 1066 cm^{-1} ทั้งสองสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยง (Fan *et al.*, 2016)



ภาพที่ 24 อินฟราเรดสเปกตรัมของแบบคที่เรียลเซลล์ูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicola*; **YEST** คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง YE แบบนิ่ง **WWRST** คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง **WWR** แบบนิ่ง **YEAT** คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง YE แบบเขย่า และ **WWRAT** คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง **WWR** แบบเขย่า

4.4.4.3 การวิเคราะห์ด้วยเอกซเรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray diffraction; XRD)

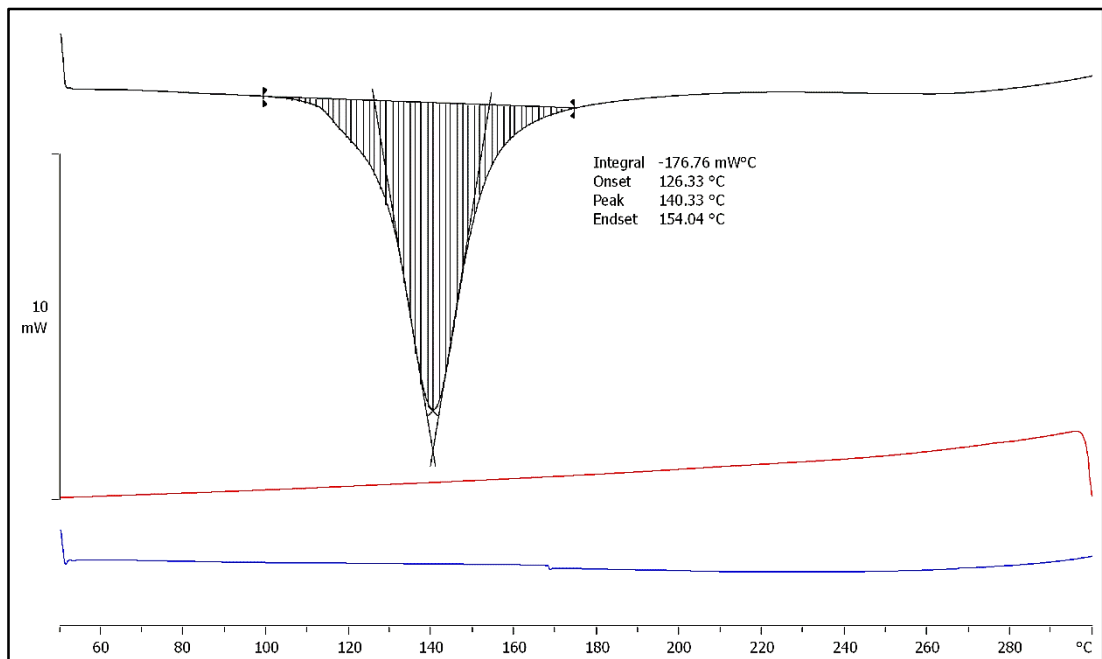
นำแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสผลิตโดย *K. nataicol* ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และแบบเขย่าในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ แสดงดังภาพที่ 25 พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบนิ่งในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ปรากฏพิกเอกลักษณะเกิดขึ้นสองตำแหน่งได้แก่ ตำแหน่งมุมเลี้ยวเบนที่ 2θ เท่ากับ 14.81° และ 23.18° การเพาะเลี้ยงแบบนิ่งในอาหารเพาะเลี้ยง YE ปรากฏพิกเอกลักษณะเกิดขึ้นสองตำแหน่งได้แก่ ตำแหน่งมุมเลี้ยวเบนที่ 2θ เท่ากับ 14.76° และ 23.17° การเพาะเลี้ยงแบบเขย่าในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ปรากฏพิกเอกลักษณะเกิดขึ้นสองตำแหน่งได้แก่ ตำแหน่งมุมเลี้ยวเบนที่ 2θ เท่ากับ 14.93° และ 23.09° การเพาะเลี้ยงแบบเขย่าในอาหารเพาะเลี้ยง YE ปรากฏพิกเอกลักษณะเกิดขึ้นสองตำแหน่งได้แก่ ตำแหน่งมุมเลี้ยวเบนที่ 2θ เท่ากับ 14.94° และ 23.21° จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. nataicol* ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่งและแบบเขย่า ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE ปรากฏพิกเอกลักษณะเกิดขึ้นสองตำแหน่งที่ใกล้เคียงกัน ในทุกสภาวะการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ตำแหน่งมุมเลี้ยวเบนที่ 2θ ประมาณ 14° และ 23° สอดคล้องกับการศึกษาของ Sheykhnazari *et al.* (2011) ที่รายงานว่า แบคทีเรียลเซลลูโลสผลิตโดย *Gluconacetobacter xylinus* ในอาหารเพาะเลี้ยง HS ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 7, 14 และ 21 วัน ปรากฏพิกเอกลักษณะเกิดขึ้นสองตำแหน่งได้แก่ ตำแหน่งมุมเลี้ยวเบนที่ 2θ เท่ากับ 14.5° และ 22.6° และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fan *et al.* (2016) พบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสผลิตโดย *Komagataeibacter xylinus* ในอาหารเพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือ HS และ CPPE (CPPE คือ เปลือกและกากส้มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์) ปรากฏพิกเอกลักษณะเกิดขึ้นสองตำแหน่งได้แก่ ตำแหน่งมุมเลี้ยวเบนที่ 2θ ในช่วง 11.988° - 18.187° และ 20.101° - 25.589° ทั้งสองสูตรอาหารจากการศึกษาดัชนีความเป็นผลึก (crystallinity index; CI) ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และแบบเขย่า พบว่ามีความเป็นผลึกประมาณ 72, 68, 80 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตในอาหารเพาะเลี้ยง WWR มีความเป็นผลึกสูงกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง YE ทั้งภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่งและแบบเขย่า ซึ่งความเป็นผลึกที่สูงส่งผลให้แบคทีเรียลเซลลูโลสมีความแข็งแรง ทนต่อความร้อน และทนต่อสารเคมีบางชนิด



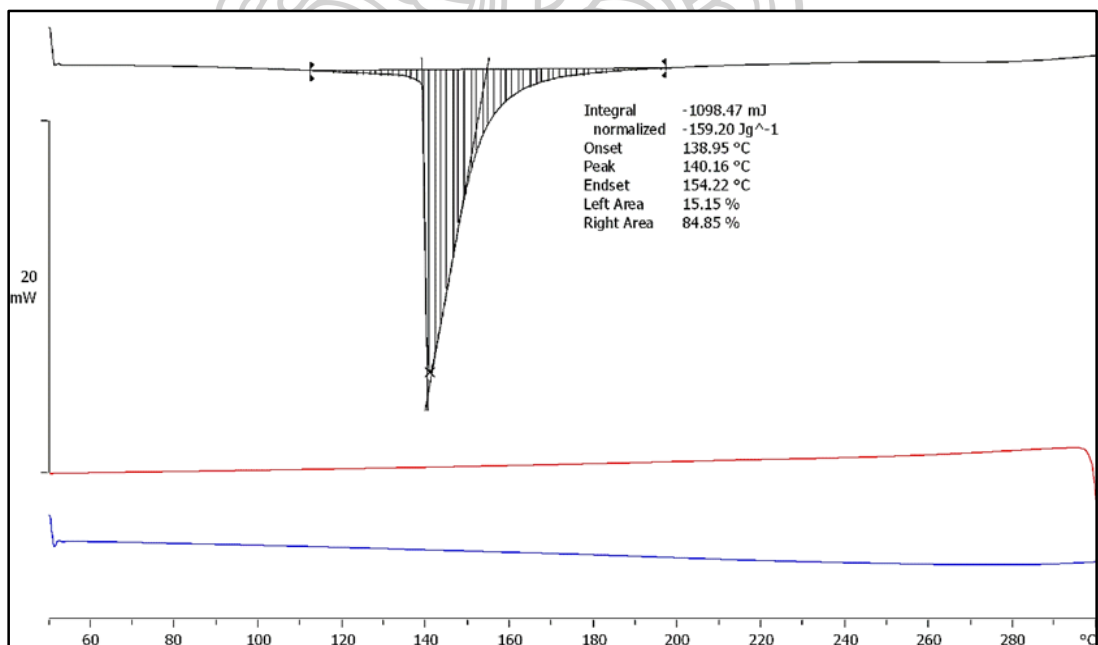
ภาพที่ 25 ดิฟแฟร็กโตแกรม XRD ของแบคทีเรียลเซดูลูโอสที่ผลิตโดย *K. Natamico*; **YE** คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง YE แบบนิ่ง **WWR** คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง WWR แบบนิ่ง **YEAT** คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง YE แบบเขย่า และ **WWRAT** คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง WWR แบบเขย่า

4.4.4.4 การวิเคราะห์ด้วยดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential Scanning Calorimetry; DSC)

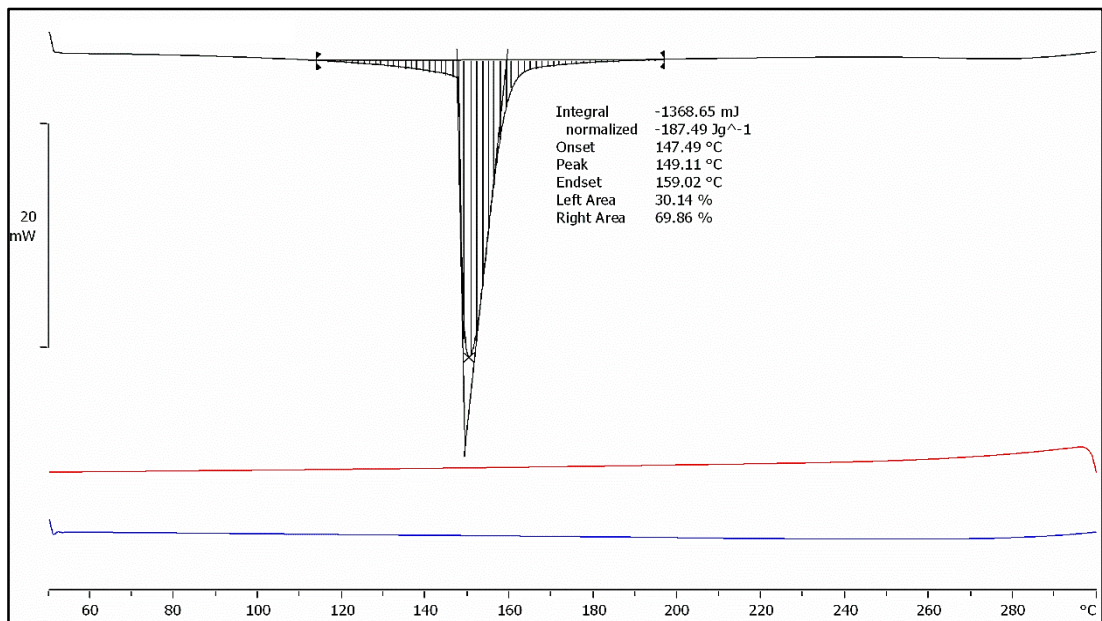
ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (DSC) เป็นเครื่องมือวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางความร้อนของสาร เมื่อถูกเพิ่มหรือลดอุณหภูมิในบรรยากาศที่ถูกควบคุม ใช้วิเคราะห์จุดหลอมเหลว (melting point) อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (glass transition temperature) ความเสถียรต่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation stability) จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยา (reaction kinetics) และความบริสุทธิ์ (purity) งานวิจัยนี้ใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์เพื่อวัดความบริสุทธิ์ โดยพิจารณาจากจุดหลอมเหลวของแบคทีเรียลเซลลูโลสผลิตโดย *K. nataicol* ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่งและแบบเขย่า ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE ซึ่งสารที่ไม่บริสุทธิ์จะมีจุดหลอมเหลวดำ และมีช่วงของการหลอมเหลวกว้าง (Giron, 2002) จากการศึกษาพบว่า จุดหลอมเหลวของแบคทีเรียลเซลลูโลสเพาะเลี้ยงแบบนิ่งในอาหาร WWR และ YE มีค่าเท่ากับ 140.33 และ 140.16 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีความกว้างของช่วงการหลอมเหลวเท่ากับ 27.71 และ 15.27 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 26 และ 27 จุดหลอมเหลวของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่เพาะเลี้ยงแบบเขย่า ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE มีค่าเท่ากับ 149.11 และ 111.03 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีความกว้างของช่วงการหลอมเหลวเท่ากับ 11.53 และ 64.47 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 28 และ 29 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า จุดหลอมเหลวของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่เพาะเลี้ยงแบบเขย่าในอาหาร YE มีค่าต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะอื่น อีกทั้งยังมีช่วงของการหลอมเหลวกว้างกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะอื่น เนื่องจากความหนาของแบคทีเรียลเซลลูโลสมีผลต่อการกำจัดเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ติดอยู่ในแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลส โดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำกลั่น ส่งผลให้เมื่อนำไปวิเคราะห์จึงพบความไม่บริสุทธิ์ของแบคทีเรียลเซลลูโลสสูงสุด เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะอื่น จากการศึกษาของ Fan *et al.* (2016) พบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสผลิตโดย *K. xylinus* ในอาหาร 2 ชนิด คือ HS และ CPPE (CPPE คือ เปลือกและกากส้มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์) แบคทีเรียลเซลลูโลสจากอาหารเพาะเลี้ยง CPPE มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 199.52 องศาเซลเซียส ในขณะที่แบคทีเรียลเซลลูโลสจากอาหารเพาะเลี้ยง HS มีจุดหลอมเหลวสูงกว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสจากในอาหารเพาะเลี้ยง CPPE เท่ากับ 204.32 องศาเซลเซียส และช่วงการหลอมเหลวของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตในอาหาร HS มีช่วงการหลอมเหลวแคบกว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสจากอาหารเพาะเลี้ยง CPPE ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง CPPE มีสิ่งปนเปื้อนสูงกว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง HS เนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยง CPPE เป็นอาหารเตรียมจากเปลือก และกากส้มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ จึงมีสารอื่นปนเปื้อนอยู่ในอาหารและถูกดูดซึมเข้าสู่แบคทีเรียลเซลลูโลส ทำให้ไม่สามารถล้างกำจัดออกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำกลั่นได้



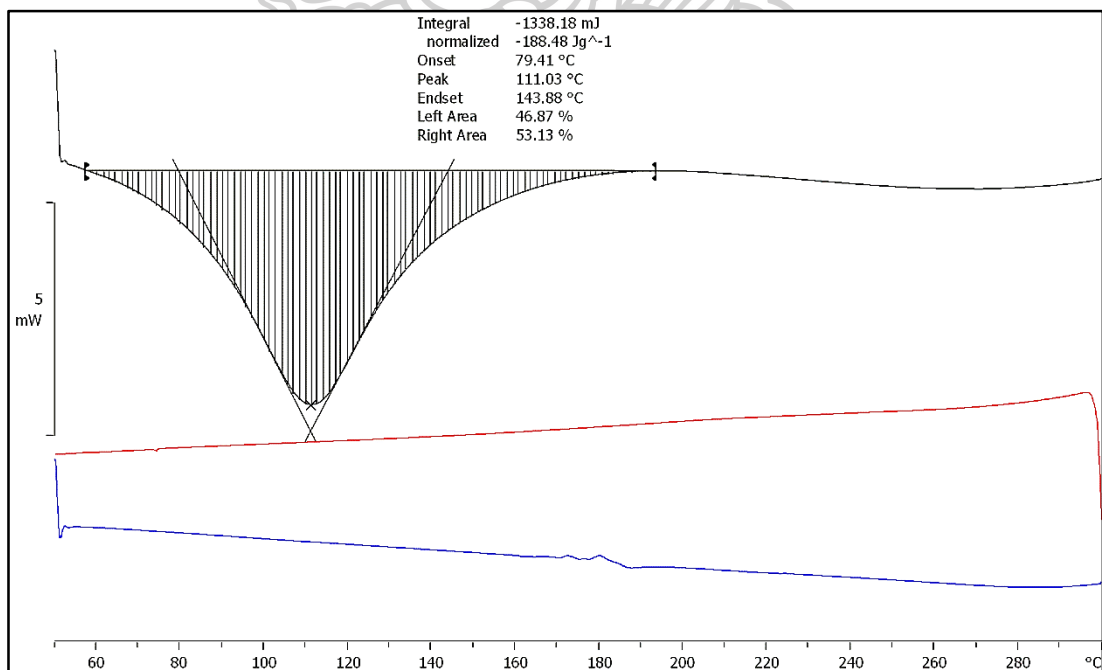
ภาพที่ 26 เทอร์โมแกรม DSC ของแบคทีเรียลเชลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง



ภาพที่ 27 เทอร์โมแกรม DSC ของแบคทีเรียลเชลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหารเพาะเลี้ยง YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง



ภาพที่ 28 เทอร์โมแกรม DSC ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า



ภาพที่ 29 เทอร์โมแกรม DSC ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหารเพาะเลี้ยง YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากแนวคิดในการนำสิ่งเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้น้ำตาล เพื่อผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส อีกทั้งยังช่วยลดต้นทุนในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส และช่วยลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้คัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากผลไม้พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ Li1 ซึ่งคัดแยกได้จากแอปเปิ้ล (*Malus pumila*) ถูกจำแนกเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง YE ได้มากกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง SH ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร คือ ความเข้มข้นของกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 13 วัน แต่ไม่สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสเพิ่มขึ้น เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนต และผงวุ้นในอาหารเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ *K. Nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียลเซลลูโลสไม่แตกต่างกัน แต่สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง YE ได้มากกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง WWR เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเขย่า และจากการศึกษา SEM พบว่าค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลส ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าเท่ากับ 31, 49 และ 24 นาโนเมตร ตามลำดับ ดัชนีความเป็นผลึกของแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และแบบเขย่ามีค่าประมาณ 72, 68, 80 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โครงสร้างทางเคมีของแบคทีเรียลเซลลูโลสไม่มีความแตกต่างกัน ในทุกสภาวะการเพาะเลี้ยง และความบริสุทธิ์ของแบคทีเรียลเซลลูโลสอยู่ในช่วง 140-149 องศาเซลเซียส ในขณะที่แบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง YE ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า มีความบริสุทธิ์น้อยกว่าเท่ากับ 111 องศาเซลเซียส จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า น้ำขาวข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีต้นทุนต่ำ เพื่อผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย *K. Nataicola* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นการนำสิ่งเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์แทนการทิ้งลงสู่ธรรมชาติ เพื่อช่วยลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมได้อีกแนวทางหนึ่ง

รายการอ้างอิง

- Alaban, C. A. (1962). Studies on the optimum conditions for Nata de coco bacterium or Nata"formation in coconut water. *The Philippine Agricultural Scientist*, 45, 490-515.
- Aloni, Y., Cohen, R., Benziman, M. and Delm, D. (1983). Solubilization of the UDP-glucose:1,4-beta-D-glucan 4-beta-D-glucosyltransferase (cellulose synthase) from *Acetobacter xylinum*. A comparison of regulatory properties with those of the membrane-bound form of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 4419-4423.
- Alvarez, A. D., Pate, M., Booker, I. and Markowitz, L. (2004). Effectiveness of a biocellulose wound dressing for the treatment of chronic venous leg ulcers: Results of a single center randomized study involving 24 patients. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*, 16(7), 224-233.
- Alvarez, D. A., Petty, J. D., Huckins, J. N., Jones-Lepp, T. L., Getting, D. T., Goddard, J. P. and Manahan, S. E. (2009). Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(7), 1640-1648.
- Andreyeva, L. N. and Biryukov, V. V. (1973). Analysis of mathematical models of the effect of pH on fermentation processes and their use for calculating optimal fermentation conditions. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 0(4-1), 61-76.
- Bae and Shoda, M. (2005). Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production using Box-Behnken design. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(1), 20-28.
- Bae, Sugano, Y. and 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.
- Barud, H. S., Barrios, C., Regiani, T., Marques, R. F. C., Verelst, M., Dexpert-Ghys, J., Messaddeq, Y. and Ribeiro, S. J. L. (2008). Self-supported silver nanoparticles

- containing bacterial cellulose membranes. *Materials Science and Engineering: C*, 28(4), 515-518.
- Bilgi, E., Bayir, E., Sendemir-Urkmez, A. and Hames, E. E. (2016). Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean. *International Journal of Biological Macromolecules*, 90, 2-10.
- Bodin, A., Bäckdahl, H., Petersen, N. and Gatenholm, P. (2011). 2.223 - Bacterial Cellulose as Biomaterial A2 - Ducheyne, Paul. In *Comprehensive Biomaterials* (pp. 405-410). Oxford: Elsevier.
- Brown, R. M. J. (2004). Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science*, 42(3), 487-495.
- Cai, Z. and Kim, J. (2010). Bacterial cellulose/ poly (ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility. *Cellulose*, 17(1), 83-91.
- Carreira, P., Mendes, J. A. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D. and Neto, C. P. (2011). Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource Technology*, 102(15), 7354-7360.
- Chao, Ishida, T., Sugano, Y. and Shoda, M. (2000). Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(3), 345-352.
- Chao, Sugano, Y., Kouda, T., Yoshinaga, F. and Shoda, M. (1997). Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* with an air-lift reactor. *Biotechnology Techniques*, 11(11), 829-832.
- Chawla, R. P., Bajaj, B. I., Survase, A. S. and Singhal, S. R. (2009). Microbial cellulose: fermentative production and applications. *Fermentative Production of Microbial Cellulose, Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107-124.
- Christner, C., Wyrwa, R., Silvia, M., Ilertz, G. K., Thiericke, R., Grabley, S., Schumann, D. and Fischer, G. (1999). Synthesis and cytotoxic evaluation of cycloheximide derivatives as potential inhibitors of FKBP12 with neurodegenerative properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 3615-3622.
- Collier, M. and Hollinworth, H. (2000). Pain and tissue trauma during dressing change. *Nursing Standard*, 14(40), 71-73.

- Credou, J. and Berthelot, T. (2014). Cellulose: from biocompatible to bioactive material. *Journal of materials chemistry*, 2, 4767-4788.
- Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S. and Brown, R. M. (2006). Microbial cellulose the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27(2), 145-151.
- Deinema, M. H. and Zevenhuizen, L. P. T. M. (1917). Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation. *Archives of Microbiology*, 78(1), 42-57.
- Dourado, F., Rynğajllo, M., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Bielecki, S. and Gama, M. (2016). Chapter 1 - Taxonomic review and microbial ecology in bacterial Nano cellulose fermentation. In *Bacterial Nanocellulose* (pp. 1-17). Amsterdam: Elsevier.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Eming, S. A., Smola, H. and Krieg, T. (2002). Treatment of chronic wounds: state of the art and future concepts. *Cells Tissues Organs*, 172(2), 105-117.
- Fan, X., Gao, Y., He, W., Hu, H., Tian, M., Wang, K. and Pan, S. (2016). Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste of citrus peel and pomace using *Komagataeibacter xylinus*. *Carbohydrate Polymers*, 151, 1068-1072.
- Giron, D. (2002). Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 68(2), 335-357.
- Gomes, F. P., Silva, N. H. C. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Duarte, M. F., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P. and Freire, C. S. R. (2013). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. *Biomass and Bioenergy*, 55, 205-211.
- Gromet-Elhanan, Z. and Hestrin, S. (1963). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. VI. Growth on citric acid-cycle intermediates. *Journal of Bacteriology*, 85, 284-292.
- Guzman, M. D., Alabastro, E. F. and Tinsay, C. B. (1982). A submerged process for the production of nata. *NRCP. Materials Research Bulletin*, 37(1), 1-50.

- Hestrin, S. and Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58(2), 345-352.
- Hibbert, H. and Barsha, J. (1931). Synthetic cellulose and textile fibers from glucose. *Journal of the American Chemical Society*, 53(10), 3907–3907.
- Hong, F. and Qiu, K. (2008). An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* ATCC 23770. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 545-549.
- Huang, C., Guo, H. J., Xiong, L., Wang, B., Shi, S. L., Chen, X. F., Lin, X. Q., Wang, C., Luo, J. and Chen, X. D. (2016). Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydrate Polymers*, 136, 198-202.
- Hungund, B. (2013). Production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* gh-2 using dual and cheaper carbon sources. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 05(02).
- Hwang, J. W., Yang, Y. K., Hwang, J. K., Pyun, Y. R. and Kim, Y. S. (1999). Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(2), 183-188.
- Iguchi, M., Yamanaka, S. and Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35(2), 261–270.
- Ishihara, M., Matsunaga, M., Hayashi, N. and Tišler, V. (2002). Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 986-991.
- Isizawa, S. and Araragi, M. (1976). Chromogenicity of actinomycetes. In *Actinomycetes: The Boundary Microorganisms* (pp. 43-65). Tokyo, Japan: Toppan Co.
- Jagannath, A., Kalaiselvan, A., Manjunatha, S. S., Raju, P. S. and Bawa, A. S. (2008). The effect of pH, sucrose and ammonium sulphate concentrations on the production of bacterial cellulose (Nata-de-coco) by *Acetobacter xylinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2593–2599.
- Jahn, C. E., Selimi, D. A., Barak, J. D. and Charkowski, A. O. (2011). The dickeya dadantii

- biofilm matrix consists of cellulose nanofibres, and is an emergent property dependent upon the type III secretion system and the cellulose synthesis operon. *Microbiology*, 157, 2733-2744.
- Jaiyen, P. (2013). *Seed vigor tests in khao dowk mali 105 and rd 15 rice varieties*. (Master of Science), Suranaree,
- Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Kubiak, K., Ludwicka, K. and Bielecki, S. (2016). Chapter 2 - Bacterial nanocellulose synthesis, recent findings. In *Bacterial Nanocellulose* (pp. 19-46). Amsterdam: Elsevier.
- Johnson, D. C. and Neogi, A. N. (1989). *Sheeted products formed from reticulated microbial cellulose*: Us Patent US4863565.
- Jonas, R. and Farah, L. F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1), 101-106.
- Joseph, G., Rowe, G., Margaritis, A. and Wan, W. (2003). *Effects of polyacrylamide-co-acrylic acid on cellulose production by Acetobacter xylinum* (Vol. 78).
- Kim and Triplett, B. A. (2001). Cotton fiber growth in planta and in vitro. Models for plant cell elongation and cell wall biogenesis. *Plant Physiology*, 127(4), 1361.
- Klemm, D., Schumann, D., Kramer, F., Heßler, N., Hornung, M., Schmauder, H.-P. and Marsch, S. (2006). Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. In *Polysaccharides II* (pp. 49-96).
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U. and Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1561-1603.
- Kongruang, S. (2008). Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 148(1-3), 245-156.
- Kováč, L. and Subik, J. (1970). Some aspects of the preparation of yeast protoplasts and isolation of mitochondria. *Acta Faciiltatis Medicae Universitatis Brunensis*, 37, 91-94.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jeziarska, A., Gonçalves-Miskiewicz, M., Turkiewicz, M. and Bielecki, S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*,

29(4), 189–195.

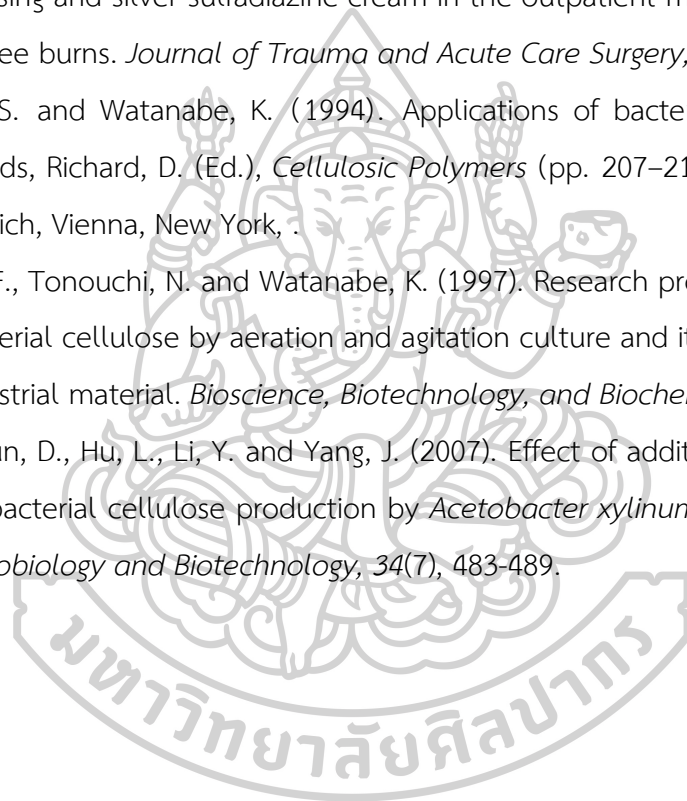
- Legeza, V. I., Galenko-Yaroshevskii, V. P., Zinov'ev, E. V., Paramonov, B. A., Kreichman, G. S., Turkovskii, I. I., Gumenyuk, E. S., Karnovich, A. G. and Khripunov, A. K. (2004). Effects of new wound dressings on healing of thermal burns of the skin in acute radiation disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 138(3), 311-315.
- Li, Z., Wang, L., Hua, J., Jia, S., Zhang, J. and Liu, H. (2015). Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate Polymers*, 120, 115-119.
- Lin, S.-P., Loira Calvar, I., Catchmark, J. M., Liu, J.-R., Demirci, A. and Cheng, K.-C. (2013). Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose*, 20(5), 2191-2219.
- Lisdiyanti, P., Navarro Rr Fau - Uchimura, T., Uchimura T Fau - Komagata, K. and Komagata, K. (2006). Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2101–2111.
- Masaoka, S., Ohe, T. and Sakota, N. (1993). Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(1), 18-22.
- Mello, L. R., Feltrin, L. T., Fontes Neto, P. T. and Ferraz, F. A. (1997). Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study. *Journal of Neurosurgery*, 86(1), 143–150.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Morgan, J. L. W., Strumillo, J. and Zimmer, J. (2013). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, 493, 181–186.
- Mungmuang, I. and Waraeaksiri, B. (2017). The pattern of factors contributing to the success of organic thai jasmine rice growers in Chiang Rai, Phayao and Chiang Mai provinces. *Journal of Management Science Chiangrai Rajabhat University*, 12(1), 117-140.
- Nguyen, V. T., Flanagan, B., Gidley, M. J. and Dykes, G. A. (2008). Characterization of

- cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Current Microbiology* 57(5), 449-453.
- Ohara, H., Keiichiro, H. and Toshiomi, Y. (1992). Kinetic Study on pH dependence of growth and death of *Streptococcus faecalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(3), 403-407.
- Okiyama, A., Shirae, H., Kano, H. and Yamanaka, S. (1992). Bacterial cellulose I. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*. *Food Hydrocolloids*, 6(5), 471-477.
- Ramana, K. V., Tomar, A. and Singh, L. (2000). Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 245-248.
- Ross, P., Aloni, Y., Weinhouse, C., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Meyer, R. and Benziman, M. (1985). An unusual guanylyl oligonucleotide regulates cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Letters*, 186(2), 191-196.
- Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 55(1), 35-58.
- Santos, S. M., Carbajo, J. M., Quintana, E., Ibarra, D., Gomez, N., Ladero, M., Eugenio, M. E. and Villar, J. C. (2015). Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration. *Carbohydrate Polymers*, 116, 173-181.
- Shah, J. and Brown, R. M., Jr. (2005). Towards electronic paper displays made from microbial cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), 352-355.
- Sheykhnazari, S., Tabarsa, T., Ashori, A., Shakeri, A. and Golalipour, M. (2011). Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1187-1191.
- Shezad, O., Khan, S., Khan, T. and Park, J. K. (2010). Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 173-180.
- Son, H.-J., Heo, M.-S., Kim, Y.-G. and Lee, S.-J. (2001). Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*

- Stanbury, F. P. and Whitaker, A. (1984). *Principles of fermentation technology*. Oxford: Pergamon Press.
- Suehiro, A., Kanemaru, S., Umeda, H., Amano, Y., Omori, K. and Ito, J. (2007). Bacterial cellulose: A new biomaterial for mucosal regeneration of trachea. *Tissue Engineering*, 13(7), 1642–11642.
- Sulaeva, I., Henniges, U., Rosenau, T. and Potthast, A. (2015). Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1547-1571.
- Sunagawa, N., Tajima, K., Hosoda, M., Kawano, S., Kose, R., Satoh, Y., Yao, M. and Dairi, T. (2012). Cellulose production by *Enterobacter* sp. CJF-002 and identification of genes for cellulose biosynthesis. *Cellulose*, 19(6), 1989-2001.
- Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D. L., Brittberg, M. and Gatenholm, P. (2005). Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, 26(4), 419-431.
- Tanskul, S., Amornthatree, K. and Jaturonlak, N. (2013). A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2: screening and optimization of culture conditions. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 421-428.
- Ul-Islam, M., Khan, T. and Park, J. K. (2012). Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 596-603.
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y. and Yoshinaga, F. (1998). Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose*, 5, 187-200.
- Watanasit, Y., Jitsurong, S., Wansu, F. and Chichareon, V. (2009). The application of cellulose (Thainanocell[®]) wound dressing on acute wound with partial thickness loss. *Songklanagarind Medical Journal*, 27(3), 235-247.
- Welfle, K., Misselwitz, R., Welfle, H., Politz, O. and Borriss, R. (2008). Influence of Ca²⁺ on conformation and stability of three bacterial hybrid glucanases. *European Journal of Biochemistry*, 229(3), 726-735.
- Wiechula, R. (2003). The use of moist wound-healing dressings in the management of split-thickness skin graft donor sites: a systematic review. *International Journal*

of Nursing Practice, 9(2), S9-S17.

- Wiegand, C. and Klemm, D. (2005). Influence of protective agents for preservation of *Gluconacetobacter xylinus* on its cellulose production. *Cellulose*, 13(4), 485-492.
- Winter, G. D. (1962). Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature*, 193, 293.
- Wyatt, D., McGowan, D. F. and Najarian, M. P. (1990). Comparison of a hydrocolloid dressing and silver sulfadiazine cream in the outpatient management of second-degree burns. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 30(7), 857-865.
- Yamanaka, S. and Watanabe, K. (1994). Applications of bacterial cellulose. In a. C. Blends, Richard, D. (Ed.), *Cellulosic Polymers* (pp. 207–215). Carl Hanser Verlag, Munich, Vienna, New York, .
- Yoshinaga, F., Tonouchi, N. and Watanabe, K. (1997). Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(2), 219-224.
- Zhou, L., Sun, D., Hu, L., Li, Y. and Yang, J. (2007). Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(7), 483-489.







ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ Schramm and Hestrin (SH)

Glucose	20	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Anhydrous disodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	3.4	กรัม
Citric acid monohydrate (C ₆ H ₈ O ₇)	1.5	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 ด้วยกรดซิตริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Schramm and Hestrin (SH) Agar

Glucose	20	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Anhydrous disodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	3.4	กรัม
Citric acid monohydrate (C ₆ H ₈ O ₇)	1.5	กรัม
Agar powder	15	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นผงวุ้น (Agar powder) มาละลายในน้ำกลั่น และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 ด้วยกรดซิตริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร เติมผงวุ้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเทลงจานเพาะเลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเชื้อ YE

Glucose	20	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Ammonium sulphate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	5	กรัม
Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	4.1	กรัม
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH ₂ PO ₄)	3	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 ด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ YE Agar

Glucose	20	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Ammonium sulphate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	5	กรัม
Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	4.1	กรัม
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH ₂ PO ₄)	3	กรัม
Agar powder	15	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นผงวุ้น (Agar powder) มาละลายในน้ำกลั่น และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 ด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร เติมน้ำกลั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเทลงจานเพาะเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำข้าวข้าว (WWR)

Yeast extract	5	กรัม
Ammonium sulphate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	5	กรัม
Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	4.1	กรัม
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH ₂ PO ₄)	3	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำข้าวข้าวที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4

(0.1 M PBS pH 7.4)

Sodium chloride (NaCl)	80	กรัม
Sodium phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄)	11.45	กรัม
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH ₂ PO ₄)	2.4	กรัม
Potassium chloride (KCl)	2	กรัม

นำสารเคมีข้างต้นมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.4 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ควรเตรียมทันทีก่อนใช้ และไม่ควรถูกเก็บเกิน 1 เดือน หากเกิดตะกอนไม่ควรนำมาใช้

สารละลาย 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS))

3, 5-Dinitrosalicylic acid; DNS (C ₇ H ₄ N ₂ O ₇)	10	กรัม
Sodium hydroxide (NaOH)	10	กรัม
Phenol (C ₆ H ₆ O)	2	กรัม
Sodium sulfite (Na ₂ SO ₃)	1	กรัม

ละลาย DNS ในน้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ให้สารละลายสีเหลืองใส และค่อยๆ เติมนโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป เมื่อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมนโซเดียมซัลไฟต์และฟีนอลลงไป จากนั้นคนผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บ DNS reagent ในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร (5 % (w/v) Phenol)

ชั่งฟีนอล 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ละลายฟีนอลจนเป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายสารละลายจากบีกเกอร์ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นกลั้วบีกเกอร์อีกครั้ง เพื่อชะสารละลายที่เกาะติดตามภาชนะออกมา จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร (40 % (w/v) Potassium sodium tartrate)

ชั่งโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตจนเป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายสารละลายจากบีกเกอร์ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นกลั้วบีกเกอร์อีกครั้ง เพื่อชะสารละลายที่เกาะติดตามภาชนะออกมา จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (0.1 N Sodium hydroxide)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จนเป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายสารละลายจากบีกเกอร์ลงในขวดปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นกลั้วบีกเกอร์อีกครั้ง เพื่อชะสารละลายที่เกาะติดตามภาชนะออกมา จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

สารละลายกรดซิตริก 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร (5% (w/v) Citric acid)

ชั่งกรดซิตริก 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ละลายกรดซิตริกจนเป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายสารละลายจากบีกเกอร์ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นกลั้วบีกเกอร์เพื่อชะสารละลายที่ติดภาชนะออก จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลาย 1 มิลลิลิตร ต้องชั่งน้ำตาลกลูโคส 100×10^{-6} กรัม

ถ้าสารละลาย 100 มิลลิลิตร ต้องชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.01 กรัม

ดังนั้น ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.01 กรัม ลงบนกระดาษอะลูมิเนียม นำน้ำตาลกลูโคสที่ชั่งได้ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 10 การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 40, 50, 60, 70 ,80 ,90 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลอดที่	ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคส (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)
1	0	0.00	1.00	1.00
2	40	0.40	0.60	1.00
3	50	0.50	0.50	1.00
4	60	0.60	0.40	1.00
5	70	0.70	0.30	1.00
6	80	0.80	0.20	1.00
7	90	0.90	0.10	1.00
8	100	1.00	0.00	1.00

การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลาย 1 มิลลิลิตร ต้องชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.5×10^{-3} กรัม

ถ้าสารละลาย 100 มิลลิลิตร ต้องชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.05 กรัม

ดังนั้น ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.05 กรัม ลงบนกระดาษอะลูมิเนียม นำน้ำตาลกลูโคสที่ชั่งได้ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 11 การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.25, 0.30 ,0.35, 0.40 และ 0.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หลอดที่	ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคส (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)
1	0.00	0.00	1.00	1.00
2	0.25	0.50	0.50	1.00
3	0.30	0.60	0.40	1.00
4	0.35	0.70	0.30	1.00
5	0.40	0.80	0.20	1.00
6	0.45	0.90	0.10	1.00



ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐานและการคำนวณ

กราฟมาตรฐานของน้ำตาลทั้งหมด (total sugar)

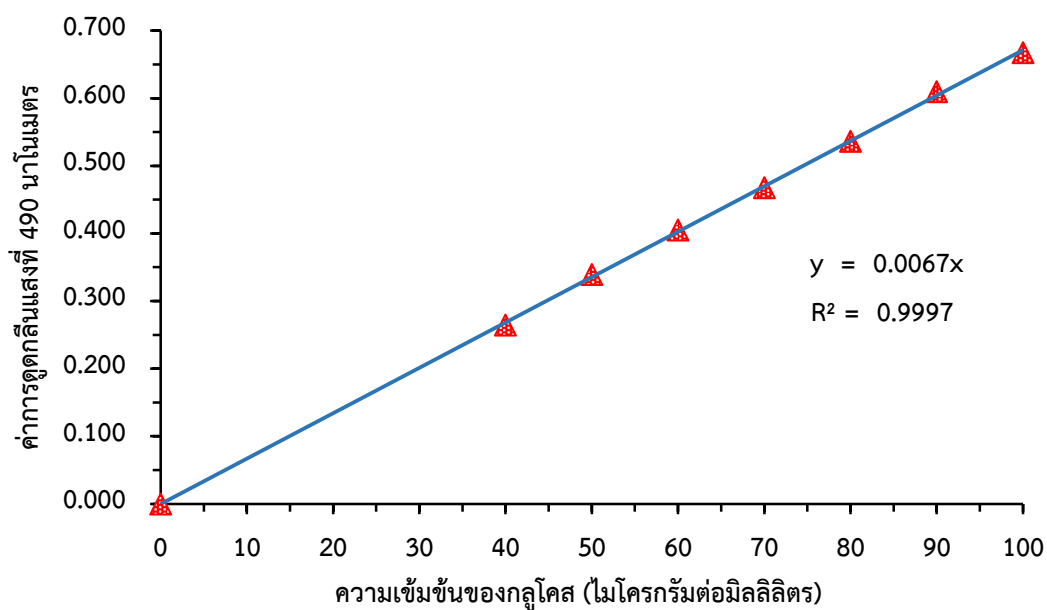
1 ปีเปตต์สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองให้ได้ความเข้มข้นของกลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 9

2 ปีเปตต์ฟินอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ ลงในสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นตั้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000	0.000
40	0.278	0.253	0.263	0.265
50	0.336	0.345	0.337	0.339
60	0.405	0.392	0.418	0.405
70	0.445	0.471	0.487	0.468
80	0.540	0.531	0.538	0.536
90	0.594	0.621	0.614	0.610
100	0.676	0.662	0.664	0.667



ภาพที่ 30 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสวิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

จากกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ได้สมการ $y = 0.0067x$

โดย y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

สามารถคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้ดังนี้

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 490 นาโนเมตร}}{0.0067} \times \text{เจือจาง}$$

กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

1 ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานกลูโคส 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองให้ได้ความเข้มข้นของกลูโคส ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 10

2 ปิเปตต์ DNS reagent 3 มิลลิลิตร ลงในสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ผสมให้เข้ากัน

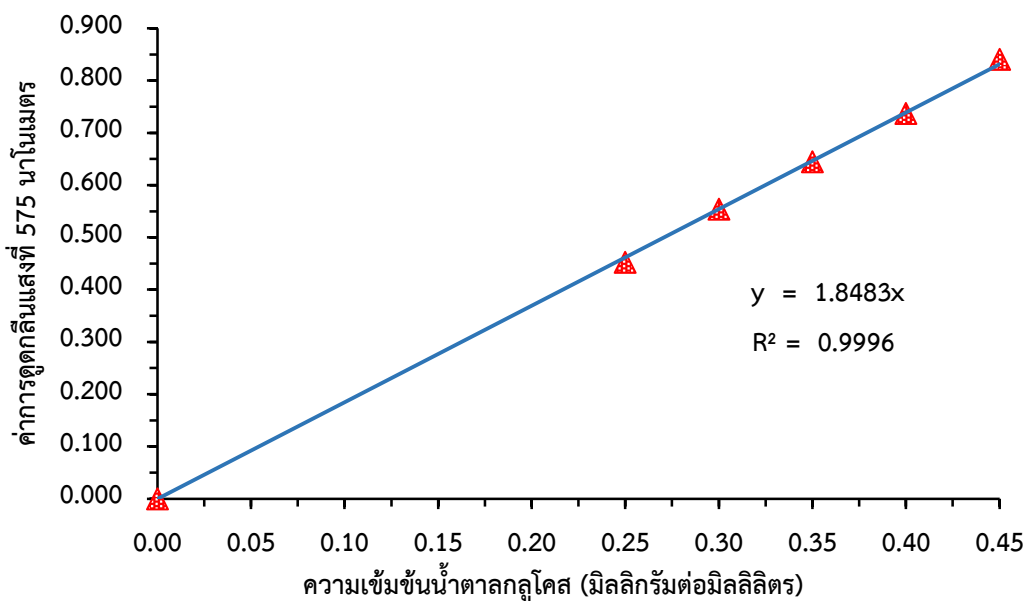
3 ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใช้พาราฟิล์มปิดหลอดทดลองให้สนิท

4 ปิเปตต์โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของกลูโคสในที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร

ตารางที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.00	0.000	0.000	0.000	0.000
0.25	0.441	0.462	0.455	0.453
0.30	0.536	0.567	0.560	0.554
0.35	0.636	0.638	0.661	0.645
0.40	0.727	0.721	0.763	0.737
0.45	0.841	0.841	0.840	0.841



ภาพที่ 31 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

จากกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ได้สมการ $y = 1.8483x$

โดย y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

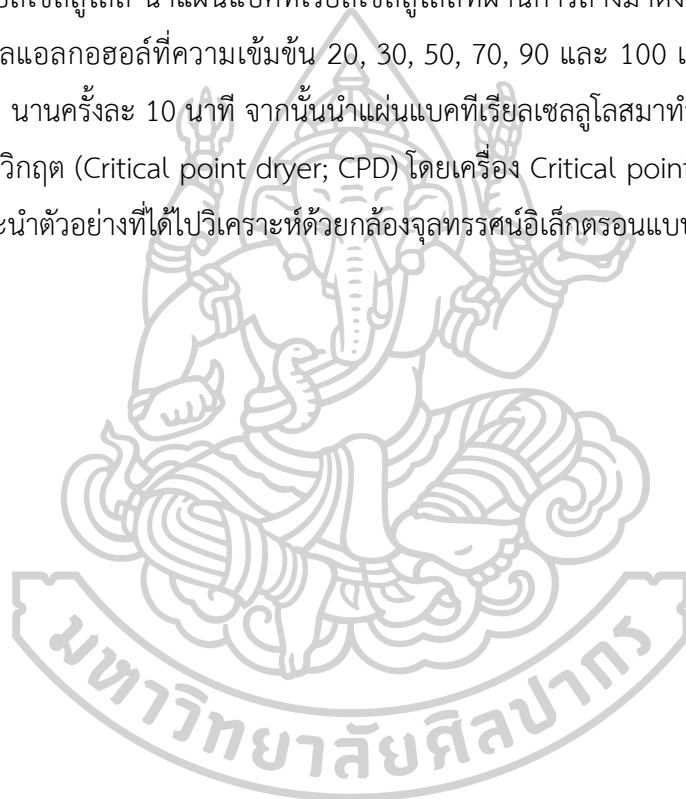
สามารถคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดังนี้

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 575 นาโนเมตร}}{1.8483} \times \text{เงื่อจาง}$$

การเตรียมตัวอย่างแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสก่อนส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM)

เตรียมแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสที่เพาะเลี้ยงในอาหาร WWR ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ภายใต้สภาวะการหมักแบบนิ่ง นำแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสมาแช่ในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีการเขย่าเบาๆ ตลอดเวลา เพื่อล้างเศษอาหารเพาะเลี้ยงออกจาก แผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลส นำแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผ่านการล้างมาดึ่งน้ำออก (Dehydration) โดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 20, 30, 50, 70, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร จำนวน 2 ครั้ง นานครั้งละ 10 นาที จากนั้นนำแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสมาทำให้แห้ง ด้วยเทคนิคการทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical point dryer; CPD) โดยเครื่อง Critical point dryer รุ่น K 850 ยี่ห้อ Quorum และนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดต่อไป





ภาคผนวก ค
ข้อมูลดิบการทดลอง

ตารางที่ 14 ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ของน้ำข้าวข้าวจากแหล่งที่มาต่าง ๆ แหล่งที่มา

- | | |
|-------------------------------------|--|
| 1 ร้านคุณเอ็ดดี้คณะวิศวกรรมศาสตร์ ฯ | 4 ร้านคุณสายสุนีย์โรงอาหารเพชรซ้อป |
| 2 ร้านโอเคโรงอาหารเพชรซ้อป | 5 ร้านโอเคโรงอาหารเพชรซ้อป (ข้าวกล้อง) |
| 3 ร้านสุขภาพโรงอาหารเพชรซ้อป | 6 ร้านคุณมรโรงอาหารยูเนียน |

แหล่ง ที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร				เจือ จาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
1	0.491	0.451	0.443	0.462±0.0257	20	1.378±0.07677 ^b
2	0.733	0.718	0.713	0.721±0.0104	30	3.230±0.04660 ^d
3	0.645	0.642	0.677	0.655±0.0194	30	2.931±0.08686 ^c
4	0.442	0.456	0.460	0.453±0.00954	20	1.361±0.02821 ^b
5	0.472	0.414	0.441	0.442±0.0290	10	0.660±0.0433 ^a
6	0.653	0.643	0.656	0.651±0.00681	63	6.118±0.06400 ^e

ตารางที่ 15 ความเข้มข้นน้ำตาลน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ของน้ำข้าวข้าวจากแหล่งที่มาต่างๆ แหล่งที่มา

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1 ร้านคุณเอ็ดดี้คณะวิศวกรรมศาสตร์ฯ | 4 ร้านคุณสายสุนีย์โรงอาหารเพชรช็อบ |
| 2 ร้านโอเคโรงอาหารเพชรช็อบ | 5 ร้านโอเคโรงอาหารเพชรช็อบ (ข้าวกล้อง) |
| 3 ร้านสุขภาพโรงอาหารเพชรช็อบ | 6 ร้านคุณมรโรงอาหารยูเนียน |

แหล่ง ที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร				เจือ จาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
1	0.739	0.740	0.730	0.736±0.00551	1	0.398±0.00298 ^c
2	0.220	0.219	0.217	0.219±0.00153	5	0.163±0.00413 ^d
3	0.640	0.643	0.642	0.642±0.00153	5	0.479±0.00413 ^e
4	0.410	0.415	0.396	0.407±0.00985	1	0.061±0.00533 ^b
5	0.112	0.113	0.120	0.115±0.00436	1	0.017±0.0024 ^a
6	0.528	0.532	0.525	0.528±0.00351	9	0.710±0.0171 ^f



ตารางที่ 16 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสในอาหาร WWR

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร				เจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.499	0.487	0.482	0.489	90	6.573
เจือจาง	0.330	0.347	0.352	0.343	80	4.096

ตารางที่ 17 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสในอาหาร WWR

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร				เจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.612	0.600	0.607	0.606	7	0.633
เจือจาง	0.687	0.672	0.678	0.679	4	0.405

ตารางที่ 18 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสในอาหาร WWR

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร				เจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.758	0.762	0.763	0.761	60	6.815
เจือจาง	0.683	0.684	0.686	0.684	40	4.086

ตารางที่ 19 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสในอาหาร WWR

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร				เจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.781	0.790	0.782	0.784	6	0.702
เจือจาง	0.673	0.669	0.665	0.669	5	0.499

ตารางที่ 20 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาความเข้มข้นกล้ำเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหาร WWR

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร				เจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.685	0.689	0.690	0.688	60	6.161
เจือจาง	0.683	0.684	0.686	0.684	40	4.086

ตารางที่ 21 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาความเข้มข้นกล้ำเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหาร WWR

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร				เจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.751	0.749	0.738	0.746	6	0.668
เจือจาง	0.548	0.55	0.539	0.546	5	0.407

ตารางที่ 22 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาอุณหภูมิเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหาร WWR

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร				เจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.723	0.725	0.720	0.723	60	6.472
เจือจาง	0.530	0.539	0.546	0.538	50	4.017

ตารางที่ 23 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาอุณหภูมิเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหาร WWR

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร				เจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.779	0.772	0.769	0.773	6	0.693
เจือจาง	0.598	0.581	0.59	0.590	5	0.440

ตารางที่ 24 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาการผลิตแบคทีเรียแลคโตสใน
อาหาร WWR ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร				เจือ จาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.753	0.739	0.743	0.745	60	6.672
เจือจาง	0.667	0.669	0.672	0.669	40	3.996

ตารางที่ 25 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตแบคทีเรียแลคโตสใน
อาหาร WWR ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร				เจือ จาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.783	0.789	0.779	0.784	6	0.702
เจือจาง	0.638	0.642	0.639	0.640	5	0.477

ตารางที่ 26 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาการผลิตแบคทีเรียแลคโตสใน
อาหาร WWR ที่มีการเติมผงวุ้น

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร				เจือ จาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.563	0.578	0.579	0.573	60	5.134
เจือจาง	0.888	0.898	0.879	0.888	30	3.978

ตารางที่ 27 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตแบคทีเรียแลคโตสใน
อาหาร WWR ที่มีการเติมผงวุ้น

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร				เจือ จาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.625	0.610	0.617	0.617	6	0.553
เจือจาง	0.845	0.834	0.814	0.831	2	0.248

ตารางที่ 28 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่งและแบบเขย่า สำหรับผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหาร WWR

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร				เจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.811	0.820	0.819	0.817	60	7.313
เจือจาง	0.645	0.756	0.650	0.684	40	4.082

ตารางที่ 29 ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่งและแบบเขย่า สำหรับผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหาร WWR

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร				เจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย		
เริ่มต้น	0.745	0.755	0.750	0.750	7	0.784
เจือจาง	0.795	0.783	0.789	0.789	4	0.471



ตารางที่ 30 น้ำหนักแบบคทีเรียลเซลล์แห้งที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่าง ๆ ในอาหาร WWR โดย *K. nataicola* ภายใต้สภาวะการหมักแบบนิ่ง (static culture)

ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (วัน)	น้ำหนักแบบคทีเรียลเซลล์แห้ง												น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	น้ำหนัก (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			น้ำหนัก (กรัม)				
	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)					
5	0.1799	0.1822	0.0023	0.1796	0.1818	0.0022	0.1761	0.1783	0.0022	0.0022±0.000058	0.0447±0.00115 ^a			
6	0.1828	0.1853	0.0025	0.1805	0.1829	0.0024	0.1812	0.1834	0.0022	0.0024±0.00015	0.0473±0.00306 ^a			
7	0.0628	0.0655	0.0027	0.0809	0.0835	0.0026	0.0754	0.0782	0.0028	0.0027±0.00010	0.0540±0.00200 ^b			
8	0.1796	0.1825	0.0029	0.1836	0.1863	0.0027	0.1824	0.1854	0.0030	0.0029±0.00015	0.0573±0.00306 ^b			
9	0.0598	0.0630	0.0032	0.0798	0.0830	0.0032	0.0860	0.0890	0.0030	0.0031±0.00012	0.0627±0.00231 ^c			
10	0.0593	0.0626	0.0033	0.0799	0.0830	0.0031	0.0756	0.0788	0.0032	0.0032±0.00010	0.0640±0.00200 ^{cd}			
11	0.1804	0.1838	0.0034	0.1791	0.1824	0.0033	0.1814	0.1848	0.0034	0.0034±0.000058	0.0673±0.00115 ^d			
12	0.1793	0.1830	0.0037	0.1828	0.1865	0.0037	0.1792	0.1827	0.0035	0.0036±0.00012	0.0727±0.00231 ^e			
13	0.1782	0.1824	0.0042	0.1791	0.1831	0.0040	0.1851	0.1894	0.0043	0.0042±0.00015	0.0833±0.00306 ^f			
14	0.1717	0.1759	0.0042	0.1701	0.1742	0.0041	0.1695	0.1738	0.0043	0.0042±0.00010	0.0840±0.00200 ^f			
15	0.1704	0.1746	0.0042	0.1690	0.1730	0.0040	0.1689	0.1732	0.0043	0.0042±0.00015	0.0833±0.00306 ^f			

ตารางที่ 31 น้ำหนักแบคทีเรียเซลล์แห้งที่พีเอชต่าง ๆ ในอาหาร WWR และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย *K. nativitica* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture)

พีเอช	น้ำหนักแบคทีเรียเซลล์แห้ง												น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	น้ำหนัก (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3							
	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)					
3.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000±0.0000 ^a	
3.5	0.0650	0.0660	0.0010	0.0632	0.0642	0.0010	0.0646	0.0655	0.0009	0.0655	0.0009	0.0655	0.0196±0.000693 ^b	
4.0	0.0620	0.0658	0.0038	0.0622	0.0655	0.0033	0.0671	0.0709	0.0038	0.0709	0.0038	0.0709	0.0727±0.00577 ^d	
4.5	0.0690	0.0736	0.0046	0.0688	0.0732	0.0044	0.0697	0.0742	0.0045	0.0742	0.0045	0.0742	0.0900±0.00200 ^f	
5.0	0.0630	0.0671	0.0041	0.0665	0.0702	0.0037	0.0665	0.0706	0.0041	0.0706	0.0041	0.0706	0.0793±0.00462 ^e	
5.5	0.0600	0.0623	0.0023	0.0663	0.0684	0.0021	0.0635	0.0658	0.0023	0.0658	0.0023	0.0658	0.0447±0.00231 ^c	
6.0	0.0660	0.0681	0.0021	0.0672	0.0692	0.0020	0.0615	0.0638	0.0023	0.0638	0.0023	0.0638	0.0427±0.00306 ^c	

ตารางที่ 32 น้ำหนักแบคทีเรียเซลล์สดแห้งที่ความเข้มข้นกล่าเชื้อเริ่มต้นต่าง ๆ ในอาหาร WWR พีเอช 4.5 และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย *K. Nataicola* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture)

เปอร์เซ็นต์ กล้าเชื้อ เริ่มต้น (v/v)	น้ำหนักแบคทีเรียเซลล์สดแห้ง												น้ำหนัก (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)			
	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	
2.0	0.0739	0.0761	0.0022	0.0677	0.0699	0.0022	0.0656	0.0681	0.0025	0.0023±0.00017	0.0460±0.00346 ^a		
5.0	0.0793	0.0838	0.0045	0.0650	0.0693	0.0043	0.0663	0.0709	0.0046	0.0045±0.00015	0.0892±0.00302 ^d		
8.0	0.0773	0.0801	0.0028	0.0570	0.0598	0.0028	0.0695	0.0725	0.0030	0.0029±0.00012	0.0573±0.00231 ^{bc}		
10.0	0.0612	0.0642	0.0030	0.0653	0.0682	0.0029	0.0685	0.0716	0.0031	0.0030±0.00010	0.0600±0.00200 ^{bc}		
13.0	0.0576	0.0607	0.0031	0.0713	0.0743	0.0030	0.1317	0.1347	0.0030	0.0030±0.00006	0.0607±0.00115 ^c		
16.0	0.0609	0.0634	0.0025	0.0709	0.0739	0.0030	0.0681	0.0708	0.0027	0.0027±0.00025	0.0547±0.00503 ^b		
19.0	0.0668	0.0698	0.0030	0.0696	0.0725	0.0029	0.0674	0.0702	0.0028	0.0029±0.00010	0.0580±0.00200 ^{bc}		

ตารางที่ 33 น้ำหนักแบบคทีเรียลเชลลูโลสแห้งที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในอาหาร WWR พีเอช 4.5 ความเข้มข้นกล้ำเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย *K. nataicola* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture)

อุณหภูมิ เพาะเลี้ยง (°C)	น้ำหนักแบบคทีเรียลเชลลูโลสแห้ง											
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	น้ำหนัก (กรัมต่อลิตร)	
	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)			
4	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000±0.0000 ^a
25	0.1830	0.1927	0.0097	0.1815	0.1911	0.0096	0.1815	0.1912	0.0097	0.1912	0.0097	0.1933±0.001155 ^c
30	0.1800	0.1842	0.0042	0.1849	0.1895	0.0046	0.1800	0.1847	0.0047	0.1847	0.0047	0.0900±0.00529 ^b
35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000±0.0000 ^a

ตารางที่ 34 น้ำหนักแบบคทีเรียลเซลลูโลสแห้งที่ความเข้มข้นแคลเซียมคาร์บอเนตต่าง ๆ ในอาหาร WWR พีเอช 4.5 ความเข้มข้นกลีเซอรีน 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย *K. nataicola* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture)

เปอร์เซ็นต์ แคลเซียม คาร์บอเนต (w/v)	น้ำหนักแบบคทีเรียลเซลลูโลสแห้ง											
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			น้ำหนักเฉลี่ย		
	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัมต่อลิตร)
0	0.1879	0.1975	0.0096	0.1814	0.1914	0.0100	0.1786	0.1886	0.0100	0.0099±0.00023	0.1973±0.004619 ^c	
0.5	0.1780	0.1831	0.0051	0.1806	0.1853	0.0047	0.1792	0.1840	0.0048	0.0049±0.00021	0.0973±0.00416 ^b	
1.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000±0.00000	0.00000±0.0000 ^a	

ตารางที่ 35 น้ำหนักแบบคทีเรียลเซลลูโลสแห้งในอาหารต่างชนิดกันโดย *K. nataicola* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture)

อาหาร เลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักแบบคทีเรียลเซลลูโลสแห้ง											
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			น้ำหนักเฉลี่ย		
	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัมต่อลิตร)
YE	0.6210	0.7765	0.1555	0.5354	0.6894	0.1540	0.5237	0.6820	0.1583	0.1559±0.0022	3.1187±0.0437	
HS	0.5332	0.5460	0.0128	0.4473	0.4587	0.0114	0.4580	0.4707	0.0127	0.0123±0.0008	0.2460±0.0451	

ตารางที่ 36 น้ำหนักแบคทีเรียลเซลล์แห้งที่ความเข้มข้นผ้งวนต่าง ๆ ในอาหาร WWR ที่เอช 4.5 ความเข้มข้นกล้ำเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย *K. nataicola* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture)

เปอร์เซ็นต์ ผ้งวน (w/v)	น้ำหนักแบคทีเรียลเซลล์แห้ง												น้ำหนัก (กรัมต่อลิตร)
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			น้ำหนัก (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)		
	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)				
0	0.1795	0.1892	0.0097	0.1778	0.1878	0.0100	0.1780	0.1880	0.0100	0.0099±0.00017	0.1980±0.00346 ^c		
0.2	0.1780	0.1861	0.0081	0.1828	0.1901	0.0073	0.1839	0.1912	0.0073	0.0076±0.00046	0.1513±0.009238 ^b		
0.3	0.1809	0.1887	0.0078	0.1810	0.1884	0.0074	0.1809	0.1884	0.0075	0.0076±0.00021	0.1513±0.004163 ^b		
0.4	0.1799	0.1883	0.0084	0.1771	0.1840	0.0069	0.1798	0.1876	0.0078	0.0077±0.00075	0.1540±0.01510 ^b		
0.5	0.1811	0.1879	0.0068	0.1777	0.1841	0.0064	0.1816	0.1886	0.0070	0.0067±0.00031	0.1347±0.006110 ^a		
0.6	0.1804	0.1867	0.0063	0.1825	0.1895	0.0070	0.1787	0.1853	0.0066	0.0066±0.00035	0.1327±0.007024 ^a		

ตารางที่ 37 น้ำหนักแบคทีเรียเซลล์แห้งในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE พีเอช 4.5 ความเข้มข้นกล้ำเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย *K. nataicola* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture)

อาหาร เลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักแบคทีเรียเซลล์แห้ง											
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			น้ำหนักเฉลี่ย		
	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)		
WWR	0.3690	0.4081	0.0391	0.3656	0.4055	0.0399	0.3646	0.4045	0.0399	0.0396±0.0000462		
YE	0.3630	0.4023	0.0393	0.3604	0.4000	0.0396	0.3618	0.4000	0.0382	0.0390±0.0000737		

ตารางที่ 38 น้ำหนักแบคทีเรียเซลล์แห้งในอาหารเพาะเลี้ยง WWR และ YE พีเอช 4.5 ความเข้มข้นกล้ำเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน โดย *K. nataicola* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า (agitate culture)

อาหาร เลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักแบคทีเรียเซลล์แห้ง											
	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			ครั้งที่ 3			น้ำหนักเฉลี่ย		
	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	ก่อน (กรัม)	หลัง (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)		
WWR	0.1800	0.1887	0.0087	0.1807	0.1901	0.0094	0.1816	0.1911	0.0095	0.0092±0.000044		
YE	0.3622	0.4450	0.0828	0.3658	0.4457	0.0799	0.3660	0.4451	0.0791	0.0806±0.000195		

ตารางที่ 39 การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลส
ผลิตโดย *K. nataicola* ในอาหารเพาะเลี้ยง YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง

Valid	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
14.760	1	2	2	2
20.873	1	2	2	4
23.799	2	4	4	8
28.004	4	8	8	16
29.519	1	2	2	18
33.003	2	4	4	22
33.657	3	6	6	28
35.546	1	2	2	30
37.339	1	2	2	32
38.488	2	4	4	36
39.604	1	2	2	38
40.150	1	2	2	40
46.205	3	6	6	46
46.674	3	6	6	52
47.598	2	4	4	56
50.269	1	2	2	58
51.553	1	2	2	60
53.216	2	4	4	64
56.008	3	6	6	70
59.038	1	2	2	72
59.406	1	2	2	74
60.855	3	6	6	80
62.619	1	2	2	82
66.336	1	2	2	84

ตารางที่ 40 การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลส
ผลิตโดย *K. nataicola* ในอาหารเพาะเลี้ยง YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง

Valid	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
67.958	1	2	2	86
74.678	1	2	2	88
76.976	1	2	2	90
79.208	2	4	4	94
88.557	1	2	2	96
88.803	1	2	2	98
100.538	1	2	2	100
Total	50	100	100	

ตารางที่ 41 ค่าทางสถิติจากการวิเคราะห์หาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลส
ผลิตโดย *K. nataicola* ในอาหารเพาะเลี้ยง YE ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง

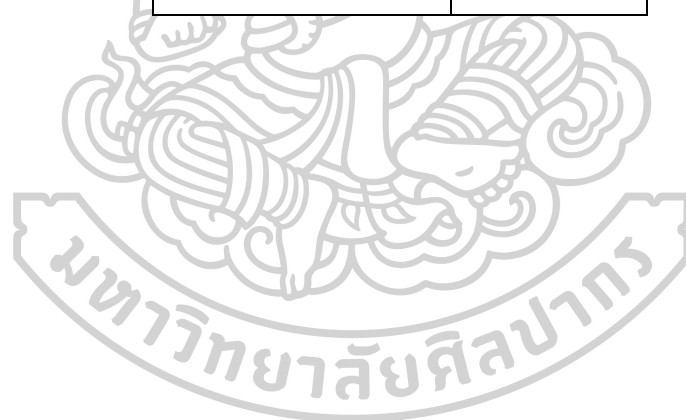
N	Valid	50
	Missing	0
Mean	49.147	
Std. Error of Mean	2.717	
Median	46.674	
Mode	28.004	
Std. Deviation	19.209	
Variance	369.001	
Range	85.778	
Minimum	14.76	
Maximum	100.538	
Sum	2457.359	

ตารางที่ 42 การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลสผลิต
โดย *K. nataicola* ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง

Valid	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
6.601	1	2	2	2
13.201	1	2	2	4
14.760	1	2	2	6
18.669	1	2	2	8
20.873	7	14	14	22
23.799	2	4	4	26
26.403	5	10	10	36
27.215	2	4	4	40
28.004	4	8	8	48
29.519	5	10	10	58
33.003	5	10	10	68
33.657	1	2	2	70
35.546	1	2	2	72
37.339	2	4	4	76
39.604	1	2	2	78
40.150	1	2	2	80
41.746	1	2	2	82
42.265	1	2	2	84
46.674	4	8	8	92
53.216	1	2	2	94
56.781	1	2	2	96
59.772	1	2	2	98
62.271	1	2	2	100
Total	50	100	100	

ตารางที่ 43 ค่าทางสถิติจากการวิเคราะห์หาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลส
ผลิตโดย *K. nataicola* ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง

N	Valid	50
	Missing	0
Mean		31.687
Std. Error of Mean		1.664
Median		29.519
Mode		20.873
Std. Deviation		11.765
Variance		138.407
Range		55.670
Minimum		6.601
Maximum		62.271
Sum		1584.393



ตารางที่ 44 การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียเซลลูโลสผลิต
โดย *K. nataicola* ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า

Valid	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
6.623	1	2	2	2
9.366	3	6	6	8
13.245	1	2	2	10
14.808	4	8	8	18
18.731	2	4	4	22
19.868	8	16	16	38
20.942	2	4	4	42
23.878	6	12	12	54
26.49	4	8	8	62
27.305	2	4	4	66
28.097	3	6	6	72
29.617	6	12	12	84
33.113	2	4	4	88
35.663	4	8	8	96
41.884	1	2	2	98
42.437	1	2	2	100
Total	50	100	100	

ตารางที่ 45 ค่าทางสถิติจากการวิเคราะห์หาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลส
ผลิตโดย *K. nataicola* ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ
เขย่า

N	Valid	50
	Missing	0
Mean		24.090
Std. Error of Mean		1.154
Median		23.878
Mode		19.868
Std. Deviation		8.163
Variance		66.629
Range		35.814
Minimum		6.623
Maximum		42.437
Sum		1204.518



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายพิพัฒน์ สุดยิ่ง
วัน เดือน ปี เกิด	10 กุมภาพันธ์ 2536
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลห้วยยอด อำเภอห้วยยอด จังหวัดตรัง
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2553 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาปลายจาก โรงเรียนห้วยยอด อำเภอห้วยยอด จังหวัดตรัง พ.ศ. 2557 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม พ.ศ. 2558 ศึกษาต่อระดับปริญญาโทบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 48/1 หมู่ 6 ตำบลปากแจ่ม อำเภอห้วยยอด จังหวัดตรัง 92190
ผลงานตีพิมพ์	Pipat Sudyng and Phimchanok Jaturapiree. Screening of cellulose producing microorganisms from fruits collected from local markets in Thailand. The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, 28-30 November 2016, 658-664 (Poster presentation and Proceeding) Pipat Sudyng and Phimchanok Jaturapiree. Screening and optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from starchy wastewater. The 7th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, 25-28 July 2017 (Poster presentation) Pipat Sudyng and Phimchanok Jaturapiree. Bacterial cellulose production by "Komagataeibacter nataicola" using water from washing rice as substrate and optimization of culture conditions. The 2018 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2018), 7-9 February 2018 (Poster presentation) Pipat Sudyng and Phimchanok Jaturapiree. Production and structural characterization of nano bacterial cellulose by "Komagataeibacter nataicola" using water from washing rice. International Conference of Agriculture and Natural Resources, 26-28 April 2018 (Poster presentation)