



## รายงานการวิจัย เรื่อง

การผลิตแผ่นฟิล์มบรรจุภัณฑ์แอคทีฟ จากแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม  
ประเภทแป้ง

Production of active packaging film from bacterial cellulose produced by starchy waste  
water

## ชื่อผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพีริย์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
สำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์  
มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2563

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2562 จากสำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ และได้รับการสนับสนุน จาก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร



Research Title	Production of active packaging film from bacterial cellulose produced by starchy waste water
Researcher	Assoc. Prof. Dr. Phimchanok Jaturapiree Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University
Research Grants	Fiscal Year 2019 Silpakorn University Research, Innovation and Creativity Administration Office
Year of completion	2020
Type of research	Experimental development
Subjects	Biotechnology

#### Abstract

Among available active packaging materials, bacterial cellulose products have attracted increasing interest due to their edibility, biodegradability and potential as a good carrier of a wide range of antimicrobial agents. In this study, bacterial cellulose was produced by *Komagataeibacter nataicola* Li1 from rice washing drainage (RWD) as an inexpensive carbon source. The structure and physical properties of bacterial cellulose were characterized using SEM, FTIR, XRD and DSC. A kind of antimicrobial bacterial cellulose film was developed and evaluated its antimicrobial property. Bacterial cellulose films from rice washing drainage containing nisin showed effectiveness in controlling *B. cereus* and *S. aureus*. Bacterial cellulose films from rice washing drainage containing *Tagetes erecta* L. extract showed effectiveness in controlling *B. cereus*, *E. coli* and *S. aureus*.

Key words : Bacterial cellulose, Biopolymer, Active packaging film, Starchy wastewater

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการ	7
บทที่ 4 ผลการทดลอง	11
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	25
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	28
ประวัติผู้วิจัย	29
การเผยแพร่ผลงานวิจัย	33

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การพัฒนาและการประยุกต์ใช้งานของแบคทีเรียเซลลูโลส	6
2. ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยแบคทีเรียเซลลูโลสจากน้ำ ข้าวข้าวที่มีความเข้มข้นไนซิน	19
3. การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยแบคทีเรียเซลลูโลสจากน้ำข้าว ข้าวที่มีสารสกัดจากพืช	21

## สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1. โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส (ก) โครงสร้าง 3 มิติ (ข) โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส	4
2. ลักษณะภายนอกของเซลลูโลสใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	4
3. ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหาร WWR ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า (a) และ ผลการวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียเซลลูโลส (b)	12
4. อินฟราเรดสเปกตรัมของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ; <u>WWRST</u> คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง WWR แบบนิ่ง	14
5. ดิฟแฟรกโตแกรม XRD ของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ; <u>WWRST</u> คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง WWR แบบนิ่ง	16
6. เทอร์โมแกรม DSC ของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>K. Nataicol</i> ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	17
7. ฤทธิ์ต้านการเจริญของ <i>Bacillus cereus</i> โดยแบคทีเรียเซลลูโลสที่มีความเข้มข้นไนซิน 0 (A), 10000 (B), 2500 (C), 1250 (D) และ 625 (E) IU ml <sup>-1</sup>	19
8. ฤทธิ์ต้านการเจริญของ <i>Escherichia coli</i> โดยแบคทีเรียเซลลูโลสที่มีความเข้มข้นไนซิน 0 (A), 10000 (B), 2500 (C), 1250 (D) และ 625 (E) IU ml <sup>-1</sup>	20
9. ฤทธิ์ต้านการเจริญของ <i>Staphylococcus aureus</i> โดยแบคทีเรียเซลลูโลสที่มีความเข้มข้นไนซิน 0 (A), 10000 (B), 2500 (C), 1250 (D) และ 625 (E) IU ml <sup>-1</sup>	20
10. ฤทธิ์ต้านการเจริญของ <i>Escherichia coli</i> โดยแบคทีเรียเซลลูโลสที่มีสารสกัดกระชายดำ (A), กระบองเพชร (B), พริก (C), กระชาย (D), กระเทียม (E), เปลือกมังคุด (F), ดาวเรือง (G) และใบย่านาง (H) ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียเซลลูโลสในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Co)	22
11. ฤทธิ์ต้านการเจริญของ <i>Staphylococcus aureus</i> โดยแบคทีเรียเซลลูโลสที่มีสารสกัดกระชายดำ (A), กระบองเพชร (B), พริก (C), กระชาย (D), กระเทียม (E), เปลือกมังคุด (F), ดาวเรือง (G) และใบย่านาง (H) ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียเซลลูโลสในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Co)	23
12. ฤทธิ์ต้านการเจริญของ <i>Bacillus cereus</i> โดยแบคทีเรียเซลลูโลสที่มีสารสกัดกระชายดำ (A), กระบองเพชร (B), พริก (C), กระชาย (D), กระเทียม (E), เปลือกมังคุด (F), ดาวเรือง (G) และใบย่านาง (H) ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียเซลลูโลสในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Co)	24



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันเทคโนโลยีผลิตแผ่นฟิล์มได้เข้ามามีบทบาททั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อให้อาหารมีความปลอดภัย รักษาคุณภาพอาหารและรสชาติ รวมทั้งยืดอายุการเก็บรักษาอาหารให้นานขึ้น สำหรับอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ ได้มีการพัฒนาแผ่นฟิล์มที่สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ เพื่อช่วยในการรักษาคุณภาพอาหาร ตลอดจนการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ สำหรับทำวัสดุสำหรับปิดแผล การพัฒนาในด้านเทคโนโลยีผลิตแผ่นฟิล์มมีการเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยหนึ่งในนั้นคือการผลิตแผ่นฟิล์มบรรจุภัณฑ์แอคทีฟ แต่อย่างไรก็ตาม การพัฒนาแผ่นฟิล์มดังกล่าว ยังคงเน้นไปที่แผ่นฟิล์มที่ผลิตได้จากพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี เช่น HDPE ซึ่งแผ่นฟิล์มดังกล่าว เมื่อทิ้งสู่สภาวะแวดล้อมก็จะก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการย่อยสลายไม่ได้ของแผ่นฟิล์มดังกล่าว หรือถ้านำไปเผาทำลายก็จะเกิดมลพิษทางอากาศ และจากกระแสการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมของผู้บริโภคที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการรณรงค์การใช้บรรจุภัณฑ์จากพลาสติกสังเคราะห์ลดลง และหาแนวทางการใช้บรรจุภัณฑ์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยใช้บรรจุภัณฑ์ที่ผลิตได้จากธรรมชาติ รวมทั้งใช้บรรจุภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable) เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงมีการพัฒนาฟิล์มที่มีคุณสมบัติเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ โดยการผลิตแผ่นฟิล์มจากแบคทีเรียลเซลลูโลส ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยตอบโจทย์ดังกล่าวได้

นอกจากนี้ ในปัจจุบันแผ่นฟิล์มบรรจุภัณฑ์แอคทีฟ ได้เข้ามามีบทบาทมากขึ้น เนื่องจากมีประโยชน์หลายด้าน เช่น มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น ซึ่งการพัฒนาการผลิตแผ่นฟิล์มบรรจุภัณฑ์แอคทีฟจากแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตจากจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการดึงดูดความสนใจให้กับผู้บริโภคในยุคดิจิทัลนี้ ด้วยความโดดเด่นของบรรจุภัณฑ์แอคทีฟ อีกทั้งการใช้ น้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง ที่หากปล่อยลงสู่แม่น้ำจะทำให้แม่น้ำเน่าเสีย ยังเป็นการลดต้นทุนการผลิต และยังสามารถช่วยลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่งด้วย

### 1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตแผ่นฟิล์มบรรจุภัณฑ์แอคทีฟจากแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง

### 1.3 ขอบเขตในการศึกษา

ผลิตแผ่นฟิล์มบรรจุภัณฑ์แอคทีฟจากแบคทีเรียแลคโตโลสที่ผลิตจากจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง ศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียแลคโตโลสที่ผลิตได้ รวมทั้งศึกษาการเติมสารเติมแต่งเพื่อให้แผ่นฟิล์มที่ได้มีคุณสมบัติเป็นบรรจุภัณฑ์แอคทีฟ เช่น การเติมสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น

## บทที่ 2

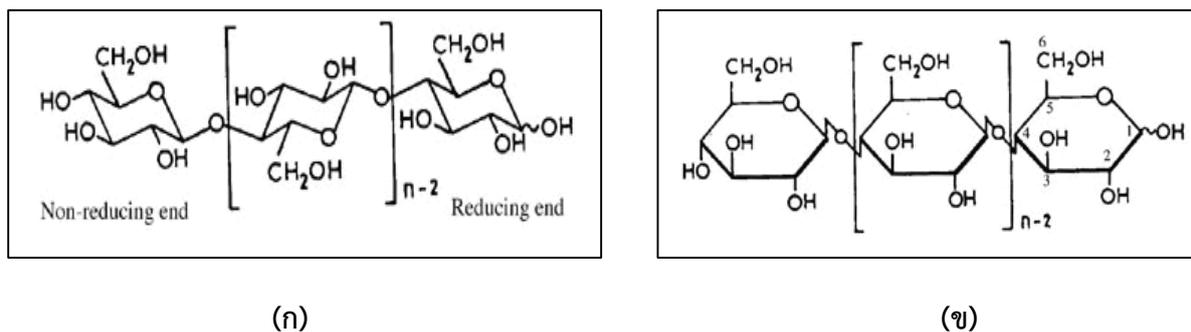
### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แบคทีเรียเซลลูโลส (Bacterial cellulose)

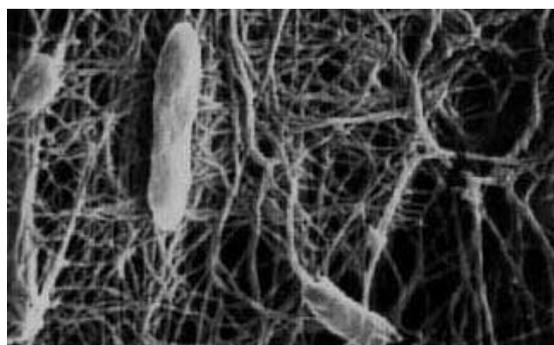
เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่มีแหล่งกำเนิดจากธรรมชาติ เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) เชิงเส้นตรงที่ประกอบด้วยหน่วยซ้ำๆ กัน มีสูตรโมเลกุลโดยทั่วไปคือ  $C_6H_{12}O_6$  เซลลูโลสมีสายโมเลกุลต่อกันเป็นพันธะที่ยาวมาก และแต่ละหน่วยถูกเรียกว่ากลูโคสสูตรโครงสร้างประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสจับกันด้วยพันธะ  $\beta(1,4)$  glycosidic linkage มีหมู่ไฮดรอกซิลถึง 3 หมู่ สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสจึงมีมาก และโครงสร้างของเซลลูโลสยังจัดตัวอย่างเป็นระเบียบ จึงทำให้เซลลูโลสมีความเป็นผลึกสูงมาก นอกจากนี้ ยังพบว่าความต้านทานแรงดึงขาด ค่าความยืดหยุ่น และอุณหภูมิการหลอมตัวสูงมาก มักจะเกิดการสลายตัวก่อนถึงอุณหภูมิหลอมตัว และมีความสามารถในการละลายต่ำ

เซลลูโลสหาได้ง่ายจากธรรมชาติ มีปริมาณมาก สามารถเกิดขึ้นได้ใหม่เรื่อยๆ และมีราคาถูกกว่าเส้นใยสังเคราะห์ ด้วยเหตุนี้จึงนิยมใช้เป็นสารเติมแต่งในพลาสติก โดยอาจเป็นทั้งสารตัวเติม และสารเสริมแรง เพื่อเป็นการลดต้นทุน เพิ่มปริมาณการผลิต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของเส้นใยที่นำมาใช้ เซลลูโลสที่สร้างจากแบคทีเรียจะเรียกว่า biocellulose หรือ bacterial cellulose ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ เซลลูโลสดังกล่าวมีหน้าที่ปกป้องและรักษาระดับน้ำและออกซิเจนภายในเซลล์ ทั้งเซลลูโลสจากพืชและจากแบคทีเรียจะมีโครงสร้างทางเคมีที่เหมือนกัน แต่มีลักษณะภายนอกต่างกัน

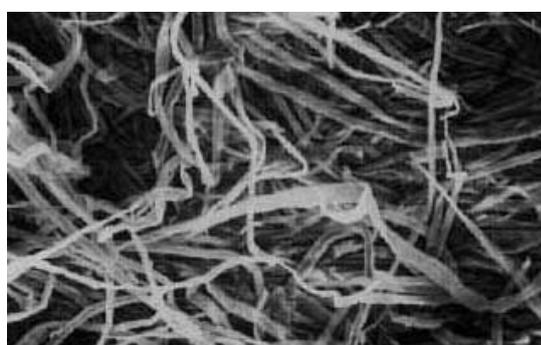
ทั้งเซลลูโลสจากพืชและจากแบคทีเรีย จะมีโครงสร้างทางเคมีที่เหมือนกัน (ภาพที่ 1) เซลลูโลสสำหรับเซลล์พืช เป็นส่วนประกอบของไมโครไฟบริล (microfibrils) ส่วนเซลลูโลสจากแบคทีเรียจะประกอบไปด้วยเส้นใยเล็กๆ มากมายเชื่อมกันเป็นร่างแหซึ่งต่างจากจากของพืช (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส (ก) โครงสร้าง 3 มิติ (ข) โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส



เซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum*



เซลลูโลสจากพืช

ภาพที่ 2 ลักษณะภายนอกของเซลลูโลสใตกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

## 2.2 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียเซลลูโลส (Applications of bacterial cellulose)

นับตั้งแต่เริ่มมีการศึกษาแบคทีเรียเซลลูโลสพบว่า แบคทีเรียเซลลูโลสมีคุณสมบัติที่โดดเด่นหลายประการ เช่น มีความบริสุทธิ์สูง ทนต่อแรงดึงสูง ความหนาแน่นของผลึกสูง มีปริมาณน้ำสูง และรูปร่างมีความคงตัว เนื่องจากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้มีการศึกษาเพื่อนำแบคทีเรียเซลลูโลสไปพัฒนาศักยภาพและประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมในด้านต่างๆ เช่น สิ่งทอ กระดาษ อาหาร ยา การบำบัดน้ำเสีย, ลำโพงคุณภาพดี และโรงกลั่น เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด (Lin และคณะ, 2016) โดยการนำแบคทีเรียเซลลูโลสไปใช้งานสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 1 และในหัวข้อดังต่อไปนี้

### การประยุกต์ใช้ด้านอาหาร

การประยุกต์ใช้เซลลูโลสบริสุทธิ์ พบว่าถูกนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความข้นหนืดและใช้เป็นสารให้ความคงตัวในการแปรรูปอาหาร Okiyama และคณะ (1992a, b, 1993) รายงานว่ามีการนำเซลลูโลสมาใช้ใน

อุตสาหกรรมอาหารโดยเติม 3 เเปอร์เซ็นต์ของเซลลูโลส ลงไปในเครื่องตีหม้อค็อกโกแลตแทนการใช้แซนแทนกัม (xanthan gum) พบว่าเครื่องตีหม้อค็อกโกแลตมีความหนืดเช่นเดียวกับการเติมแซนแทนกัม แต่เมื่อเครื่องตีได้รับความร้อน พบว่าความหนืดของเครื่องตีที่เติมแซนแทนกัมลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่เครื่องตีที่เติมเซลลูโลสความหนืดไม่ลดลง นอกจากนี้ มีการเติมเซลลูโลสลงไปใส่อิสครีมเพื่อป้องกันการไหลหลังจากใส่อิสครีมละลายซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มความเค้นเฉือน (*shear stress*) และปรากฏผลเช่นเดียวกับการเติมเซลลูโลสลงไปในตัวหู้ แแบคทีเรียเซลลูโลสเป็นสารที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร และเป็นสารที่ผ่านการรับรองโดยองค์การอาหารและยา (FDA) ว่าเป็นสารที่สามารถใช้เติมลงไปในอาหารได้อย่างปลอดภัย (generally recognized as safe; GRAS) (Lin และคณะ, 2016)

### การประยุกต์ใช้ในการผลิตกระดาษ

Johnson และ Neogi (1989) รายงานว่าแบคทีเรียเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นเม็ดๆ จะมีความเป็นกึ่งที่เหมือนตาข่ายซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการกวน โดยจะเหมาะสำหรับการนำมาผลิตเป็นกระดาษที่มีคุณภาพสูง และได้มีการเติมแบคทีเรียเซลลูโลสลงในกระดาษเพื่อให้กระดาษทนต่อแรงดึงสูง อีกทั้งยังทำให้กระดาษไม่เกิดการฉีกขาดได้ง่าย (Yamanaka และ Watanabe, 1994) Iguchi และคณะ (2000) รายงานว่าเมื่อเติม 15 เเปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียเซลลูโลสลงไปในการกระบวนการผลิตกระดาษจะทำให้กระดาษทนต่อการพับสูง เมื่อเปรียบเทียบกับกระดาษเยื่อบริสุทธิ์ นอกจากนี้ โมดูลัสของยัง (Young's modulus) เพิ่มขึ้นจาก 2.0 เป็น 3.5 (GPa)

Yoskantho และคณะ (2012) ได้ศึกษาแผ่นเซลลูโลสสำหรับผลิตเป็นกระดาษย่อยสลายได้โดยใช้แบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* พบว่าแผ่นเซลลูโลสที่เหมาะสมในการขึ้นรูปมากที่สุดคือ แผ่นที่มีความหนา 1 เซนติเมตร อบครั้งที่ 1 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง รับภาระได้ที่ 148.60 นิวตัน มีระยะยืดอยู่ที่ 35 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปกดลงแม่พิมพ์เพื่อขึ้นรูปโดยใช้เครื่องกดไฮดรอลิก ด้วยแรง 120 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร บนพื้นที่ 17×17 เซนติเมตร กดค้างไว้เป็นเวลา 2 นาที และนำกระดาษที่ขึ้นรูปสมบูรณ์แล้วไปอบซ้ำด้วยอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้กระดาษคงรูปใช้งานได้จริง และมีอัตราการคืนสภาพน้อยที่สุดโดยที่แผ่นที่เลือกนี้มีอัตราการคืนสภาพเท่ากับร้อยละ 5

### การประยุกต์ใช้ในการทางการแพทย์และเภสัชกรรม

แบคทีเรียเซลลูโลสยังมีอีกหนึ่งลักษณะพิเศษ คือ มีการคัดเลือกที่ต่ำ และยอมให้ของเหลวพวกน้ำและสารละลายอื่นที่ละลายในน้ำผ่าน เช่น กลูโคส ซูโครส เอธานอล สารละลาย NaCl และ KCl นอกจากนี้เซลลูโลสจากแบคทีเรียยังมีความโปร่งใส ทำให้สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงของบาดแผลได้ตลอดการรักษา ไม่ต้องเปิดบาดแผล ลดโอกาสเสี่ยงจากการติดเชื้อลง แบคทีเรียเซลลูโลสนำมาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมหลายรูปแบบ อาทิ ผิวหนังเทียม สำหรับผู้ป่วยบาดแผลไฟไหม้ ผู้ป่วยโรคมะเร็งผิวหนัง แผลเย็บบาดแผลที่บริเวณผิวหนัง บาดแผลเรื้อรัง การลอกผิวหนัง ผู้ได้รับการกรอหน้า และใช้กับผู้ป่วยโรค และผู้รับบริจาคผิวหนังจากการปลูกถ่ายผิวหนัง

ตารางที่ 1 การพัฒนาและการประยุกต์ใช้งานของแบคทีเรียลเซลลูโลส (Lin และคณะ, 2016)

องค์ประกอบเพิ่มเติม	การประยุกต์ใช้งาน
อนุภาคทองนาโน	ใช้เป็นแม่แบบสำหรับการตรึงเอนไซม์และการประดิษฐ์ไบโอเซนเซอร์
อนุภาคความเหนียวออกไซด์นาโน	ใช้สารที่ทำให้ความใสและใช้เป็นตัวนำไฟฟ้า
อนุภาคนิกเกิลนาโน	ใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติของแบคทีเรียลเซลลูโลสเพื่อเป็นวัสดุสำหรับการพิมพ์แม่แบบโทกราฟีและประยุกต์เป็นเซ็นเซอร์หรือแม่กระทั่งเป็นโครงเนื้อเยื่อแม่เหล็ก
อนุภาคเงินนาโน	ใช้สำหรับคัดลยกรรรมบาดแผลเนื่องจากมีความสามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส	มีบทบาทในการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของวัสดุที่ทำจากแบคทีเรียลเซลลูโลส
ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส	ใช้ในการปรับปรุงความสามารถการคืนน้ำของแบคทีเรียลเซลลูโลสในระหว่างการหมัก
โซเดียมคาร์บอเนต	เมื่อผสมกับแบคทีเรียลเซลลูโลสจะให้ป็นสารที่มีความคงตัวสูงซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตกระดาษ
ไซโลกลูแคน	เมื่อนำมารวมกับแบคทีเรียลเซลลูโลสจะทำให้เกิดเป็นผลึกขนาดนาโนส่งผลให้พื้นผิวเรียบ
ยา	เมื่อนำยามารวมกับแบคทีเรียลเซลลูโลสจะสามารถพัฒนาเป็นวัสดุตกแต่งบาดแผลและเป็นตัวนำส่งยาได้

แบคทีเรียลเซลลูโลสเป็นชีววัสดุธรรมชาติที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในหลายๆ ด้าน เนื่องจากคุณสมบัติที่แตกต่างจากวัสดุอื่นๆ เพราะฉะนั้น เพื่อตอบสนองต่อความต้องการที่เพิ่มขึ้นของการใช้แบคทีเรียลเซลลูโลส ในอุตสาหกรรมต่างๆ ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญ ด้วยเหตุนี้จึงอาจต้องนำกระบวนการวิศวกรรมใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงเข้ามาประยุกต์ใช้เพื่อผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส นอกจากนี้ การศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมและชีวเคมีอาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในระดับชีววิทยาโมเลกุลและยังได้แบคทีเรียลเซลลูโลสตามวัตถุประสงค์เพื่อเชิงพาณิชย์อีกด้วย

ได้มีการพัฒนาการผลิตแผ่นฟิล์มโดยใช้แบคทีเรียลเซลลูโลสจากน้ำมะพร้าวกับพอลิเมอร์ธรรมชาติ เพื่อทำวัสดุปิดแผล (ศรีณยู และ ชนัญ, 2555) และมีการพัฒนาการผลิตแผ่นฟิล์มที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียลเซลลูโลสจากน้ำมะพร้าว (บุษกร, 2555) แต่ยังไม่มียางานการวิจัยการพัฒนาการผลิตแผ่นฟิล์มบรรจุภัณฑ์แอคทีฟจากแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับผู้บริโภคยุคดิจิทัลที่ใส่ใจต่อสิ่งแวดล้อม

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการ

#### 3.1 การเตรียมน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง

นำน้ำทิ้งประเภทแป้ง โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาชาวข้าว (นุชนาฏ และ พิมพ์ชนก, 2562) เป็นตัวอย่างเบื้องต้นของน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง เริ่มต้นจากการนำน้ำชาวข้าวที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อขจัดตะกอนต่างๆ และนำส่วนใสที่ได้ไปผ่านการกรองโดยใช้กระดาษกรอง จากนั้นเก็บส่วนใสของน้ำชาวข้าวที่ได้นำไปใช้ในการเตรียมอาหาร (starchy wastewater medium) นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อและปรับความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร

#### 3.2 การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจากจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง

ถ่ายกล้าเชื้อ (นุชนาฏ และ พิมพ์ชนก, 2562) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหาร starchy wastewater medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งจะใช้น้ำชาวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการเติมน้ำตาลกลูโคส จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการหมักแบบนิ่ง (static culture) วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลส

#### 3.3 การทำให้แบคทีเรียเซลลูโลสบริสุทธิ์

เก็บแบคทีเรียเซลลูโลสออกจากอาหาร แล้วนำไปล้างด้วยน้ำเพื่อกำจัดองค์ประกอบของอาหารและเศษเซลล์ออก จากนั้นนำแผ่นแบคทีเรียเซลลูโลสมาต้มด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียออกจากแผ่นเซลลูโลส และนำมาทำให้เป็นกลาง โดยเปิดน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 2 วัน

#### 3.4 การศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียเซลลูโลส

นำแบคทีเรียเซลลูโลสบริสุทธิ์ที่ได้มาศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพ ดังนี้

3.4.1 การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

นำแผ่นแบคทีเรียเซลลูโลสบริสุทธิ์ ขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร วางลงบนที่ใส่ตัวอย่าง (stub) โดยใช้คาร์บอนเทปยึดติดตัวอย่าง นำไปเคลือบทองด้วยเครื่อง Rotary-pumped sputter coater รุ่น Q150R S ผลิตโดยบริษัท Quorum และวิเคราะห์สัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) รุ่น SU5000 ผลิตโดยบริษัท Hitachi ค่าความต่างศักย์ (accelerating voltage) 3.0

กิโลโวลต์ จากนั้นนำภาพที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแบคทีเรียเซลลูโลสโดยการสุ่มเส้นใยมาจำนวน 50 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม ImageJ version 1.51J8 (Bilgi *et al.*, 2016)

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

นำแผ่นแบคทีเรียเซลลูโลสบริสุทธิ์ 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  $\text{cm}^{-1}$  ความละเอียด (resolution) 4  $\text{cm}^{-1}$  (Fan *et al.*, 2016)

### 3.4.3 การวิเคราะห์ด้วยเอกซเรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray diffraction; XRD)

นำแผ่นแบคทีเรียเซลลูโลสบริสุทธิ์ 10 x 10 x 2 มิลลิเมตร วางลงบน sample holder โดยใช้เทปใสยึดติดตัวอย่าง และใช้ด้านผิวหน้าที่เรียบที่สุดในการวิเคราะห์ นำไปวางในตำแหน่งที่วางสารของเครื่อง X-Ray Diffractometer รุ่น MiniFlex II ผลิตโดยบริษัท Rigaku ซึ่งปรับกระแส 30 มิลลิแอมป์ ความต่างศักย์ 40 กิโลโวลต์ ใหญ่กับหลอดกำเนิดรังสี ตั้งค่าอัตราการหมุนของโกนิโอมิเตอร์ที่ 2 $\theta$  และตั้งพิสัยค่านุมของการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ที่ 3-70 องศา ด้วยอัตราเร็ว 2 องศาต่อนาที สเปกตรัมที่ได้เป็นการพล็อตระหว่างค่า Intensity (Cps.) ในแกน Y และค่านุม 2-theta (deg.) ในแกน X จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างผลึก (Crystalline Structure) (Bilgi *et al.*, 2016)

### 3.4.4 การวิเคราะห์ด้วยดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential Scanning Calorimetry; DSC)

นำแผ่นแบคทีเรียเซลลูโลสบริสุทธิ์ 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

ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปของเทอร์โมแกรมพล็อตระหว่างการเปลี่ยนแปลงพลังงานความร้อน (มิลลิวัตต์) กับอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) เมื่อแบคทีเรียเซลลูโลสได้รับความร้อนเกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะทางโครงสร้างและทางเคมี ทำให้ทราบค่าจุดหลอมเหลว (Melting point) ของแบคทีเรียเซลลูโลสได้ (Fan และคณะ, 2016)

### 3.5 การศึกษาผลของการยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียเซลลูโลส

#### 3.5.1 สารสกัด

สารสกัดที่ใช้ในการทดลองได้แก่ กระจ่างดำ (*Kaempferia parviflora*), กระบองเพชร (*Opuntia ficus-indica*), พริก (*Capsicum frutescens*), กระจ่าง (*Boesenbergia rotunda*), กระเทียม (*Allium sativum* Linn.), เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.), ดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) และ ใบย่านาง (*Tiliacora triandra*) จากบริษัท Asian Bioplex จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย

#### 3.5.2 การเตรียมสารละลายในจีน

ชั่งในจีน 0.5 กรัม ละลายในไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.01 M และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร ทุกขั้นตอนทำในสภาวะปลอดเชื้อ จะได้สารละลายในจีนความเข้มข้น 50,000 IU/ml<sup>-1</sup> เก็บสารละลายในจีนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (stock solution)

#### 3.5.3 การเตรียมสารละลายจากสารสกัด

ชั่งสารสกัด 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 30 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 18,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร ทุกขั้นตอนทำในสภาวะปลอดเชื้อ จะได้สารละลายสารสกัดความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 3.5.4 การเตรียมแบคทีเรียเซลลูโลสในสารละลายในจีนและในสารละลายสารสกัด

ตัดแผ่นแบคทีเรียเซลลูโลสบริสุทธิ์ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11.4 มิลลิเมตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาแช่ในสารละลายในจีน ความเข้มข้น 10000, 2500, 1250 และ 625 IU/ml<sup>-1</sup> และนำมาแช่ในสารละลายสารสกัดชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและล้างในกลีเซอรอลความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

#### 3.5.5 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar disc diffusion

เชื้อในการทดสอบมีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยี

อุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร โดยนำเชื้อทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA (Nutrient agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อทั้งหมดมาปรับความเข้มข้นเท่ากับ  $10^7$  จากนั้นใช้ก้านพันสำลีปลอดเชื้อ (sterile cotton swab) จุ่มลงในเชื้อแต่ละชนิด และนำมา swab ลงบนอาหาร NA (Nutrient agar) จำนวน 3 ระบาย ให้ทั่วผิวน้ำอาหาร ใช้คีบคีบปลอดเชื้อ (sterile forceps) คีบแผ่นแบคทีเรียลเซลล์ูลอสที่มีในซันและมีสารสกัด วางลงบนอาหารเพาะเชื้อให้แนบสนิทกับผิวน้ำอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้นรอบแผ่นแบคทีเรียลเซลล์ูลอส (inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง รายงานเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean  $\pm$  SD)

## บทที่ 4

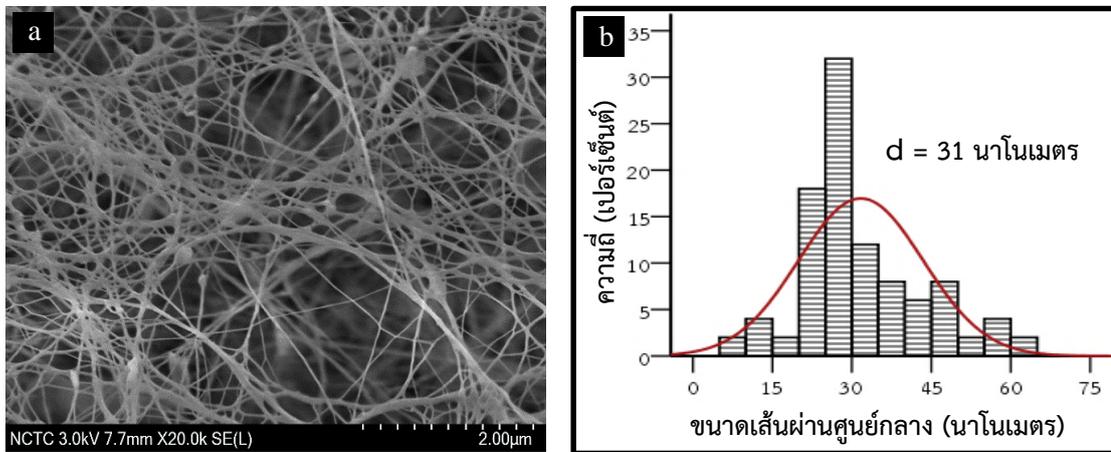
### ผลการทดลอง

#### 4.1 การศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียเซลลูโลส

4.1.1 การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

นำแผ่นแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้จากอาหาร starchy wastewater medium ซึ่งจะใช้น้ำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการเติมน้ำตาลกลูโคส โดยเชื้อ *Komagataeibacter nataicola* Li.1 (*K. Nataicola* Li.1) ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นวิเคราะห์สัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 20,000 เท่า พบว่าเส้นใยของแบคทีเรียเซลลูโลสเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบนิ่งในอาหารเพาะเลี้ยง WWR มีความหนาแน่นของเส้นใยมากและมีรูพรุนระหว่างเส้นใยน้อย เส้นใยเป็นปมในบางตำแหน่ง แสดงดังภาพที่ 3a และจากการวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางด้วยโปรแกรม ImageJ เวอร์ชัน 1.51J8 โดยสุ่มตัวอย่างของเส้นใยมาจำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแบคทีเรียเซลลูโลสที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบนิ่งในอาหารเพาะเลี้ยง WWR มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 31 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 3b

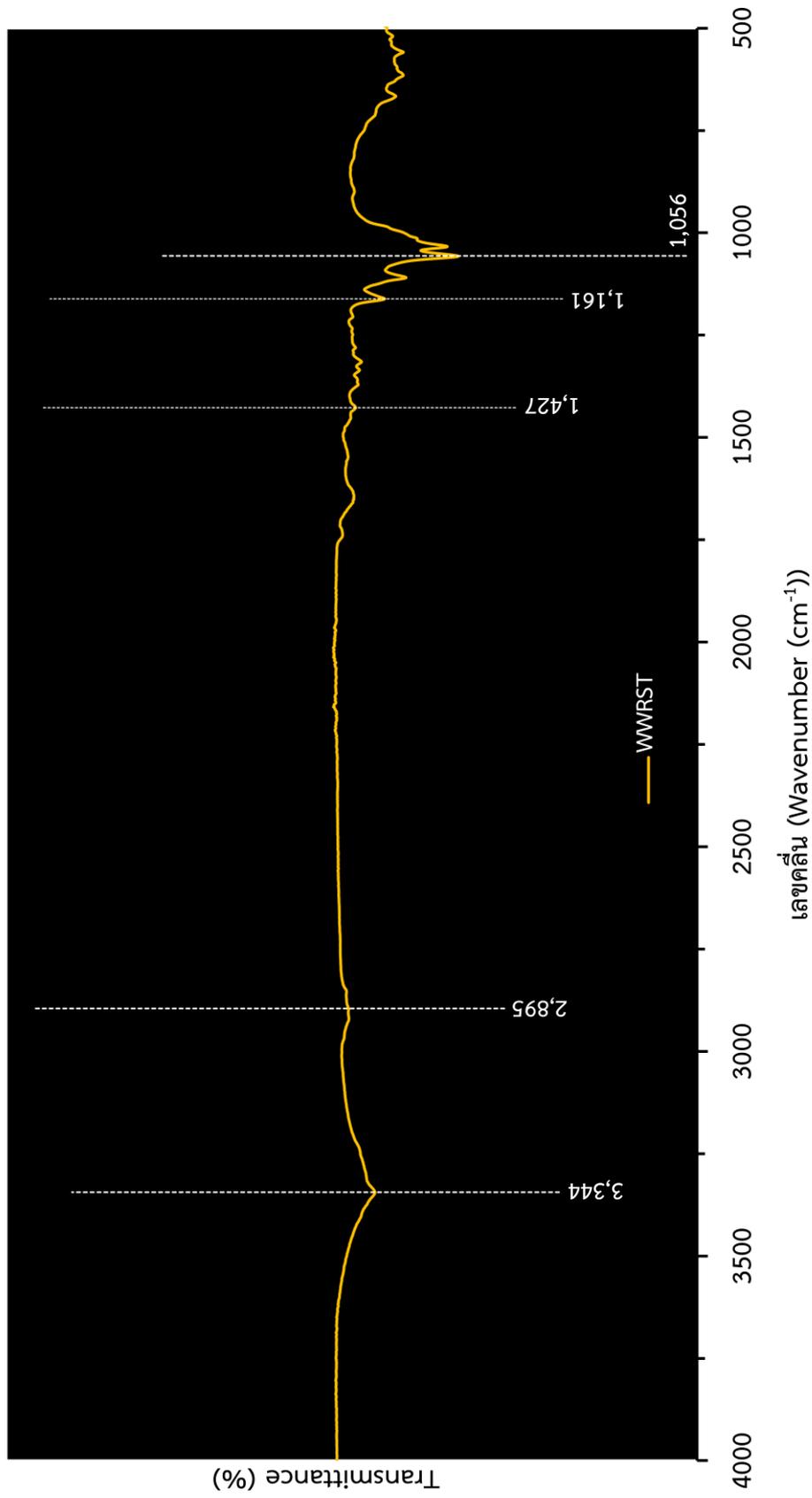
จากผลทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้มีขนาดของเส้นใยเล็กกว่าเส้นใยที่มาจากฝ้าย ซึ่งมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-500 ไมโครเมตร (Kim and Triplett, 2001) และจากการศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน พบว่าแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตโดย *Komagataeibacter xylinus* ในอาหาร 2 ชนิด คือ HS และ CPPE (CPPE คือ เปลือกและกากส้มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแตกต่างกัน เท่ากับ 60 และ 50 นาโนเมตร ตามลำดับ แม้ว่าเชื้อที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจะเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน แต่เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน จึงส่งผลให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้มีขนาดที่แตกต่างกัน (Fan *et al.*, 2016)



ภาพที่ 3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. nataicol* ในอาหาร WWR ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 20,000 เท่า (a) และ ผลการวิเคราะห์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลส (b)

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

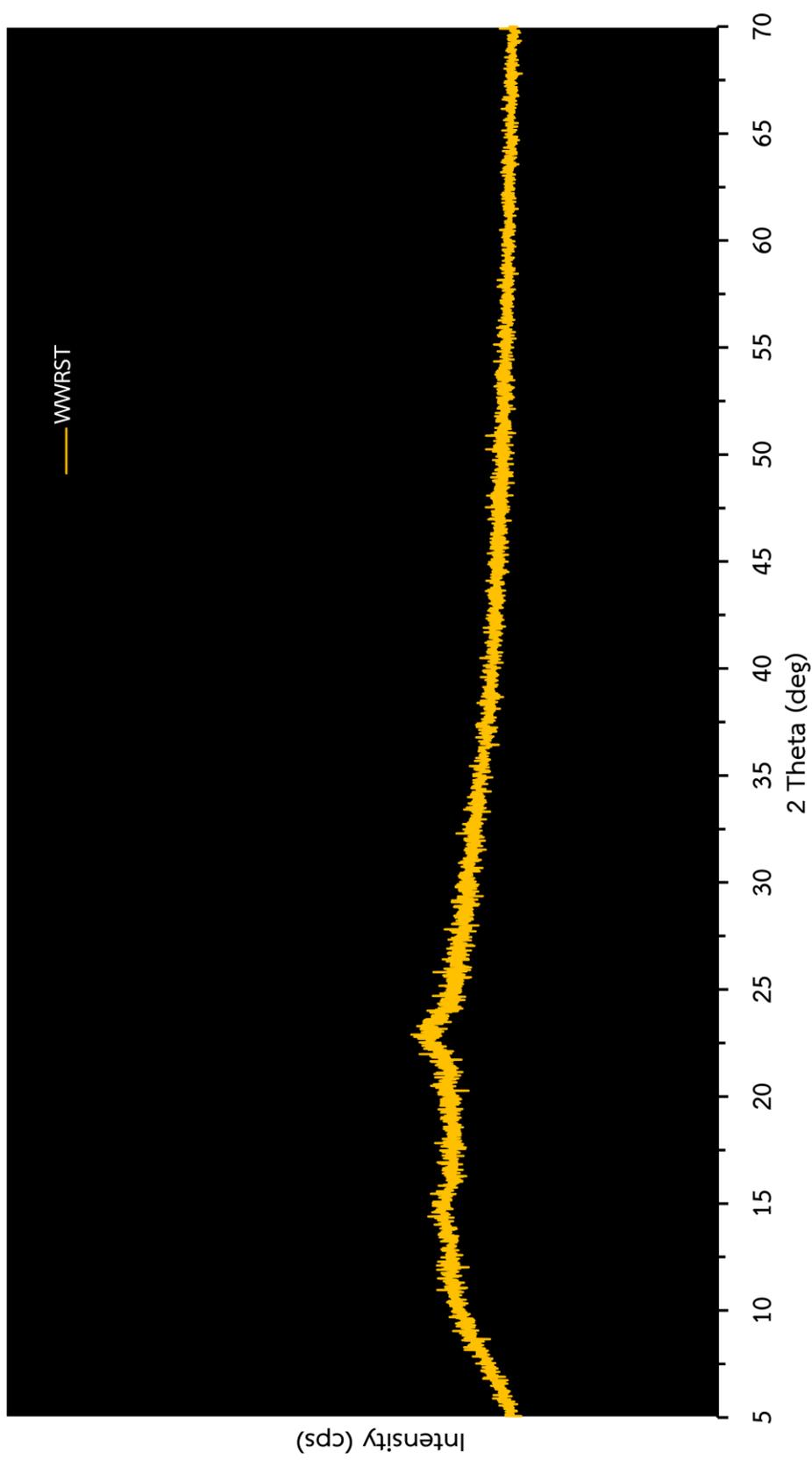
นำแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสผลิตโดย *K. nataicol* Li.1 ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นวิเคราะห์ หมูฟังก์ชัน แสดงดังภาพที่ 4 พบแถบการดูดกลืนในช่วงเลขคลื่น (wavenumber)  $3,600-3,000\text{ cm}^{-1}$  มีลักษณะเป็นพีคกว้าง (broad peak) เกิดจากการยึดของหมู่ไฮดรอกซิล ( $-\text{OH}$  group) ของ โมเลกุลน้ำตาลกลูโคส ซึ่งซ้อนทับกับแถบการสั่นแบบไม่สมมาตร (asymmetrical stretching) ของ หมูเมทิล ( $-\text{CH}_3$  group) จึงปรากฏการดูดกลืนเพียงเล็กน้อยในช่วงเลขคลื่น  $2,900-2,800\text{ cm}^{-1}$  แถบ การดูดกลืนที่ตำแหน่งเลขคลื่นประมาณ  $1,427\text{ cm}^{-1}$  เกิดการสั่นที่ผิดปกติแบบไม่สมมาตรของเมทิล ( $-\text{CH}_3$ ) และเมทิลีน ( $-\text{CH}_2$ ) แถบการดูดกลืนที่ตำแหน่งเลขคลื่นประมาณ  $1,161\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการสั่น แบบไม่สมมาตร (asymmetrical stretching) ของ  $\text{C}-\text{O}$  นอกจากนี้ แถบการดูดกลืนในช่วงเลขคลื่น  $1,076-1,023\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเกิดจากการสั่นของพันธะ  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  ของ Anhydroglucose พีคที่ปรากฏที่ ตำแหน่งเลขคลื่น  $1,150\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงพันธะ  $\text{C}-\text{C}$  และพีคที่ปรากฏที่ตำแหน่งเลขคลื่น  $903\text{ cm}^{-1}$  เกิด จากการสั่นแบบยึดของ  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  ของพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ชนิด  $\beta$ -(1,4) ที่ตำแหน่ง เลขคลื่น  $3,240$  และ  $750\text{ cm}^{-1}$  เป็นแถบสัญญาณของผลึกเซลลูโลสชนิด  $\alpha$  และที่ตำแหน่งเลขคลื่น  $3,270$  และ  $710\text{ cm}^{-1}$  เป็นแถบสัญญาณของผลึกเซลลูโลสชนิด  $\beta$  ซึ่งทั้ง 2 สัญญาณเป็น Polymorphisms ซึ่งอยู่ในรูปของเซลลูโลส (Barud *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2015) จากผลการ ทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. nataicol* ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR พบแถบการดูดกลืนที่สำคัญดังนี้ ที่ตำแหน่งเลขคลื่นในช่วง  $3,600-3,000\text{ cm}^{-1}$  การดูดกลืนเล็กน้อยในช่วงเลขคลื่น  $2,900-2,800\text{ cm}^{-1}$  และการดูดกลืนในช่วงเลขคลื่น  $1,076-1,023\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นหมูฟังก์ชันของ  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CH}$  และ  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  ตามลำดับ ซึ่งเป็นการสั่นของ พันธะที่ยืนยันได้ว่าเป็นแถบสัญญาณของแบคทีเรียลเซลลูโลส (Gomes *et al.*, 2013) และจาก การวิเคราะห์หมูฟังก์ชันของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน พบว่าแบคทีเรียล เซลลูโลสที่ผลิตโดย *Komagataeibacter xylinus* ในอาหารเพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือ HS และ CPPE (CPPE คือ เปลือกและกากส้มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์) พบแถบการดูดกลืนสำคัญที่ตำแหน่งเลข คลื่นประมาณ  $3353$ ,  $2898$ ,  $1163$  และ  $1066\text{ cm}^{-1}$  ทั้งสองสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยง (Fan และคณะ, 2016)



ภาพที่ 4 อินฟราเรดสเปกตรัมของแบบที่เรียบเซสลูโลสที่ผลิตโดย K. Nataicol; WWRST คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง WWR แบบนิ่ง

#### 4.1.3 การวิเคราะห์ด้วยเอกซเรย์ดิฟแฟรคชัน (X-ray diffraction; XRD)

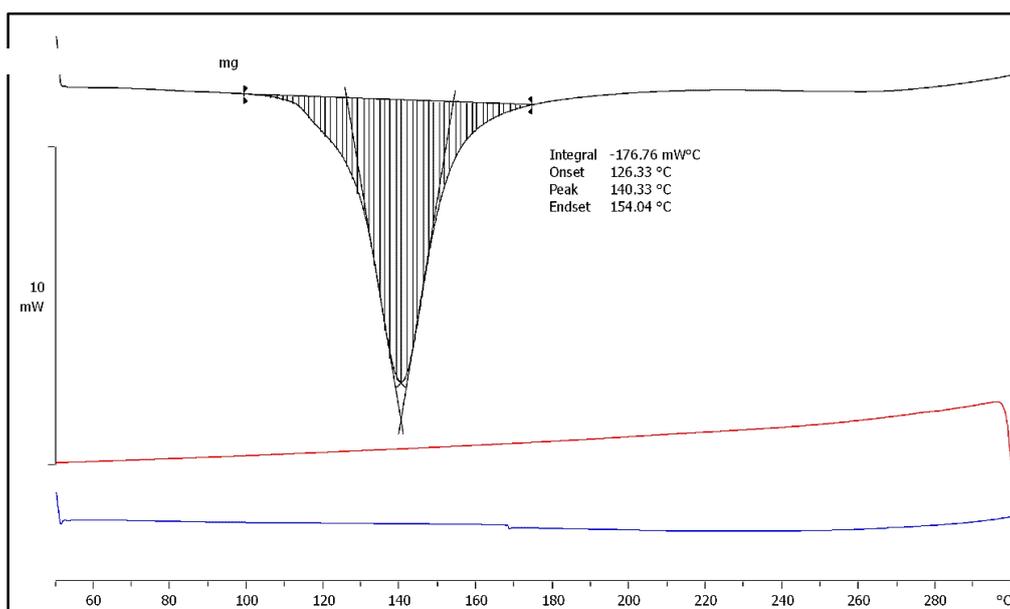
นำแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสผลิตโดย *K. nataicol* ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ แสดงดังภาพที่ 5 พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบนิ่งในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ปรากฏพีคเอกลักษณ์เกิดขึ้นสองตำแหน่งได้แก่ ตำแหน่งมุมเลี้ยวเบนที่  $2\theta$  เท่ากับ  $14.81^\circ$  และ  $23.18^\circ$  ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sheykhnazari และคณะ (2011) ที่รายงานว่า แบคทีเรียลเซลลูโลสผลิตโดย *Gluconacetobacter xylinus* ในอาหารเพาะเลี้ยง HS ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 7, 14 และ 21 วัน ปรากฏพีคเอกลักษณ์เกิดขึ้นสองตำแหน่งได้แก่ ตำแหน่งมุมเลี้ยวเบนที่  $2\theta$  เท่ากับ  $14.5$  และ  $22.6$  และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fan *et al.* (2016) พบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสผลิตโดย *Komagataeibacter xylinus* ในอาหารเพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือ HS และ CPPE (CPPE คือ เปลือกและกากส้มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์) ปรากฏพีคเอกลักษณ์เกิดขึ้นสองตำแหน่งได้แก่ ตำแหน่งมุมเลี้ยวเบนที่  $2\theta$  ในช่วง  $11.988^\circ$ - $18.187^\circ$  และ  $20.101^\circ$ - $25.589^\circ$  ทั้งสองสูตรอาหารจากการศึกษาดัชนีความเป็นผลึก (crystallinity index; CI) ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง พบว่ามีความเป็นผลึกประมาณ 72 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความเป็นผลึกที่สูงส่งผลให้แบคทีเรียลเซลลูโลสมีความแข็งแรง ทนต่อความร้อน และทนต่อสารเคมีบางชนิด



ภาพที่ 5 ดิฟแฟร็กโตแกรม XRD ของแบคทีเรียลเซตูลูโลสที่ผลิตโดย *K. Natamico*; WWRST คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง WWR แบบนิ่ง

#### 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* ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ซึ่งสารที่ไม่บริสุทธิ์จะมีจุดหลอมเหลวต่ำ และมีช่วงของการหลอมเหลวกว้าง (Giron, 2002) จากการศึกษพบว่า จุดหลอมเหลวของแบคทีเรียลเซลลูโลสเพาะเลี้ยงแบบนิ่งในอาหาร WWR มีค่าเท่ากับ 140.33 องศาเซลเซียส และมีความกว้างของช่วงการหลอมเหลวเท่ากับ 27.71 แสดงดังภาพที่ 6 จากการศึกษ ของ 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 จึงมีสารอินทรีย์อื่นปนเปื้อนอยู่ในอาหารและถูกดูดซึมเข้าสู่แบคทีเรียลเซลลูโลส ทำให้ไม่สามารถล้างกำจัดออกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำกลั่นได้



ภาพที่ 6 เทอร์โมแกรม DSC ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. Nataicol* ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง

## 4.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

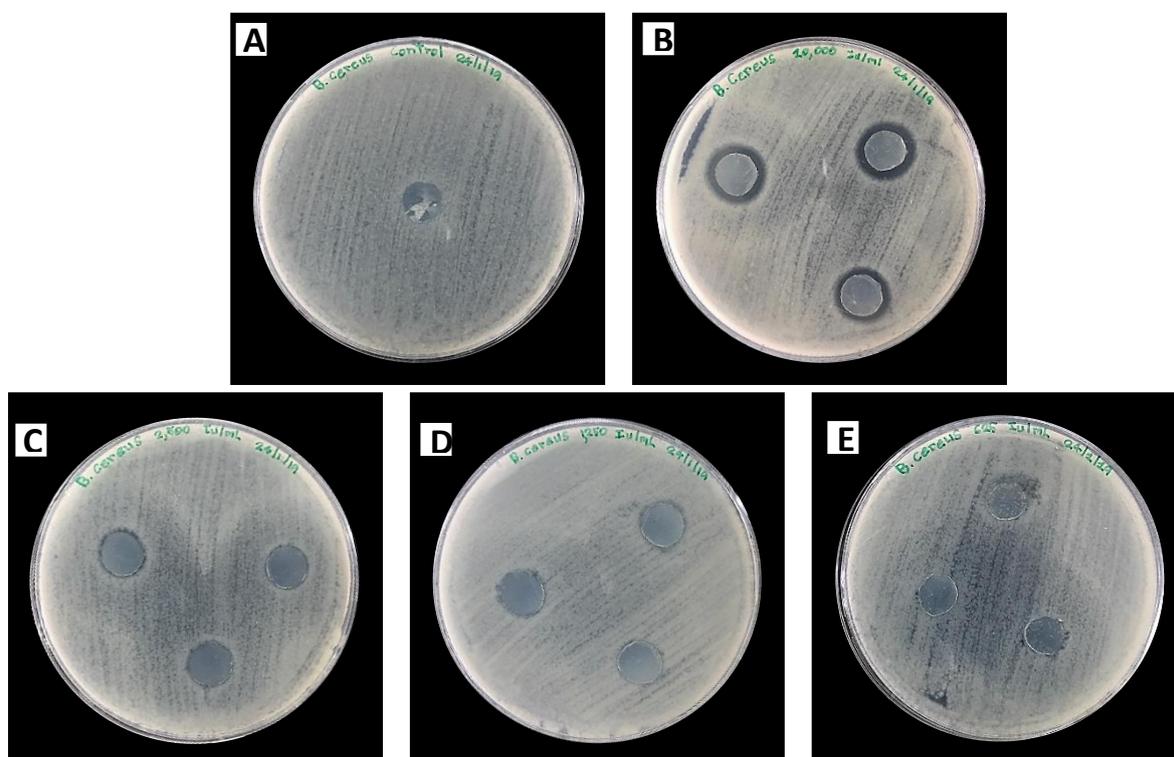
### 4.2.1 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยแบคทีเรียลเซลลูโลสจากน้ำข้าวข้าวที่มีสารไนซิน

จากการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียโดยแบคทีเรียลเซลลูโลสจากน้ำข้าวข้าวที่มีไนซินความเข้มข้น 10000, 2500, 1250 และ 625 IU/ml<sup>-1</sup> โดยใช้แบคทีเรียแกรมบวกสองสายพันธุ์ (*B. cereus* และ *S. aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบหนึ่งสายพันธุ์ (*E. coli*) ซึ่งพิจารณาจากขนาดของวงใสการยับยั้ง เมื่อทดสอบด้วยการดัดแปลงวิธี Agar disc diffusion แสดงตารางที่ 2 และ ภาพที่ 7, 8 และ 9 พบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสจากน้ำข้าวข้าวที่มีไนซินความเข้มข้น 10,000 IU/ml<sup>-1</sup> สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* และ *S. aureus* มีขนาดวงใสการยับยั้งเท่ากับ 4.97 และ 2.75 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่ไนซินความเข้มข้น 1,250 IU/ml<sup>-1</sup> สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* และ *S. aureus* มีขนาดวงใสการยับยั้งเท่ากับ 1.33 และ 0.77 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ พบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสจากน้ำข้าวข้าวที่มีไนซินทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* เนื่องจากเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

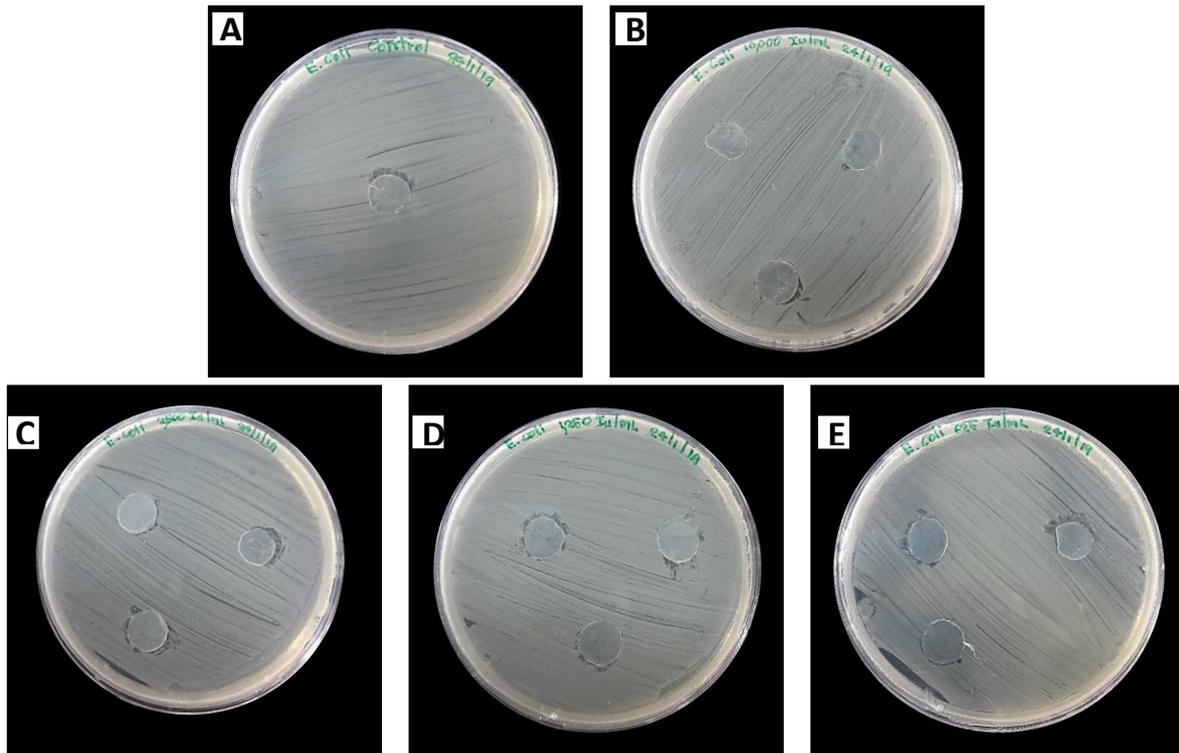
ตารางที่ 2 ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยแบคทีเรียลเซลลูโลสจากน้ำข้าวข้าวที่มีความเข้มข้นไนซิน

ความเข้มข้นไนซิน (IUml <sup>-1</sup> )	ขนาดวงใสของการยับยั้งการเจริญ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, มิลลิเมตร)		
	<i>B. cereus</i> *	<i>E. coli</i> *	<i>S. aureus</i> *
0	0	0	0
1,250	0	0	0
2,500	1.33 ± 0.750	0	0.77 ± 0.077
10,000	4.97 ± 0.860	0	2.75 ± 0.068

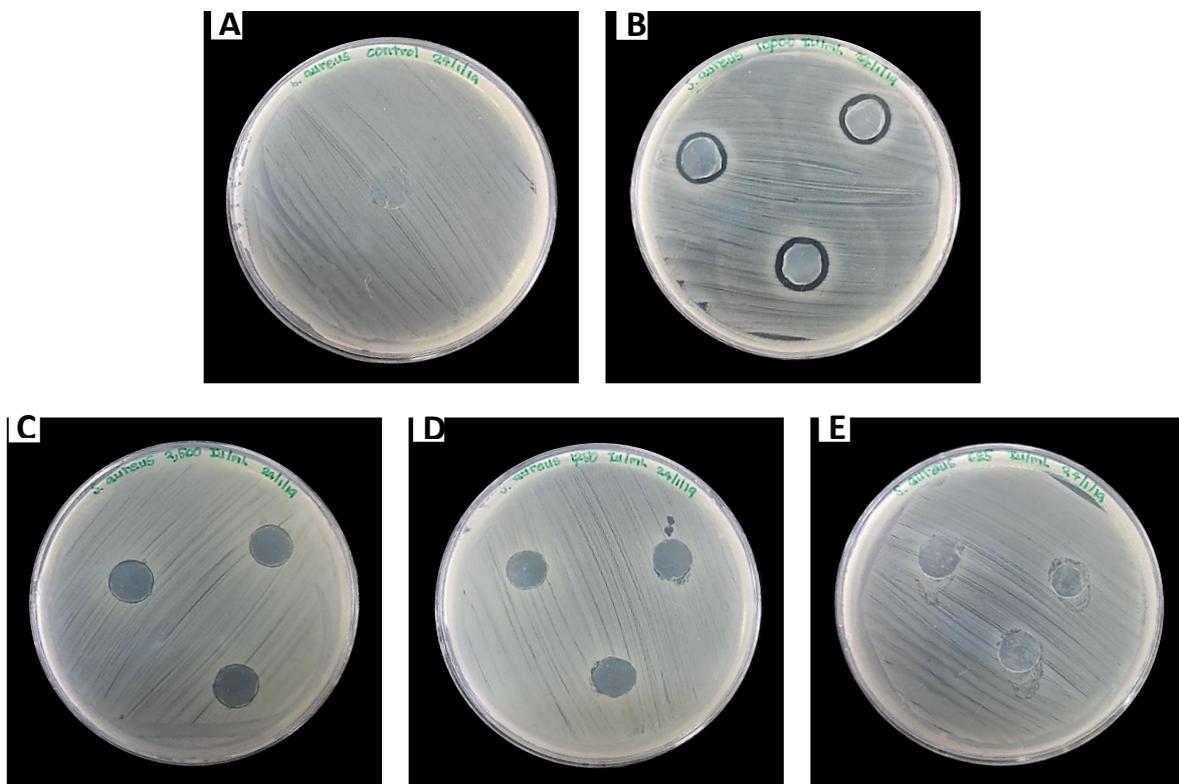
\*ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 7 ฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* โดยแบคทีเรียลเซลลูโลสที่มีความเข้มข้นไนซิน 0 (A), 10000 (B), 2500 (C), 1250 (D) และ 625 (E) IU ml<sup>-1</sup>



ภาพที่ 8 ฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Escherichia coli* โดยแบคทีเรียลเซลล์ูโลสที่มีความเข้มข้นไนซิน 0 (A), 10000 (B), 2500 (C), 1250 (D) และ 625 (E) IU ml<sup>-1</sup>



ภาพที่ 9 ฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* โดยแบคทีเรียลเซลล์ูโลสที่มีความเข้มข้นไนซิน 0 (A), 10000 (B), 2500 (C), 1250 (D) และ 625 (E) IU ml<sup>-1</sup>

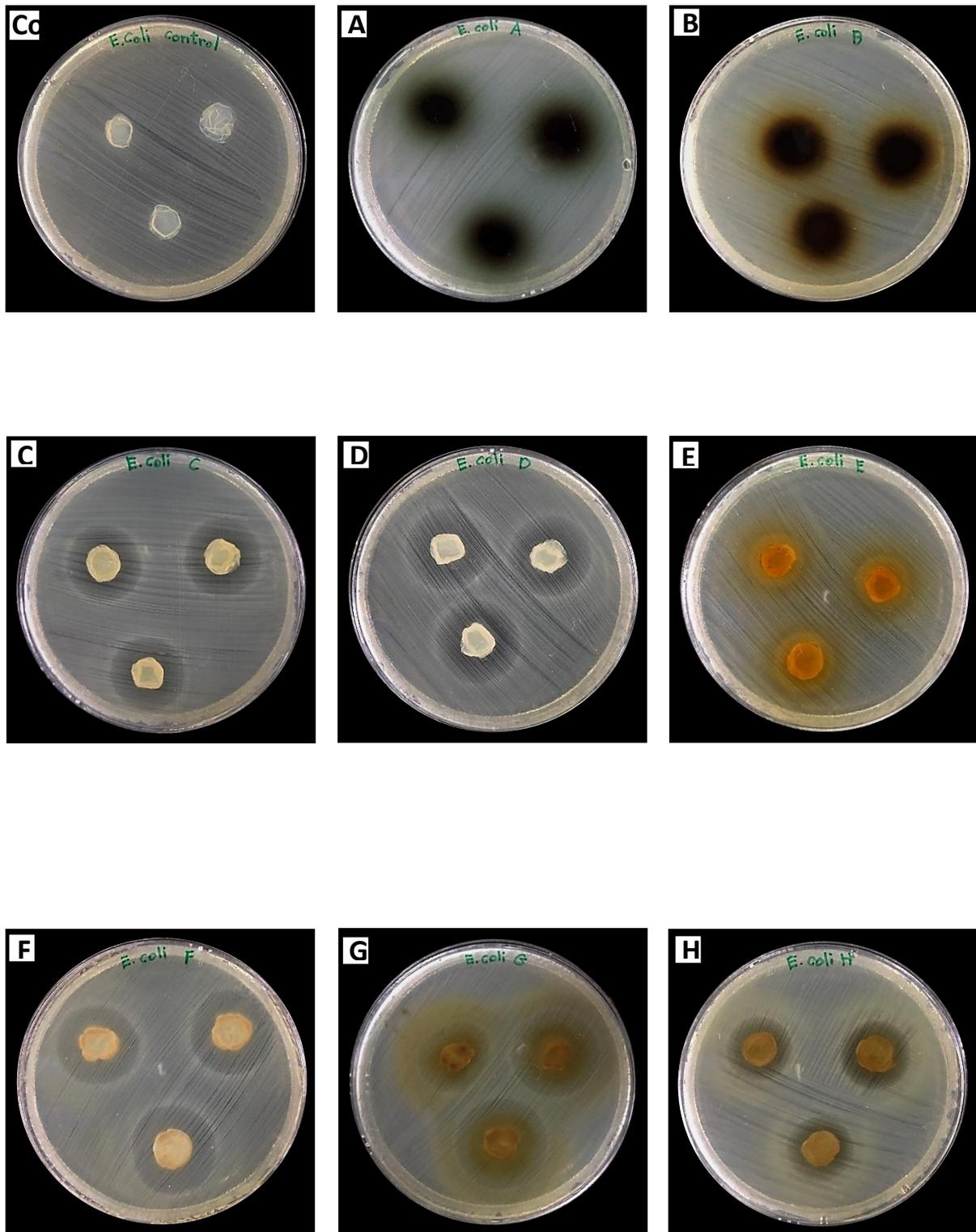
#### 4.2.2 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยแบคทีเรียลเซลลูโลสจากน้ำข้าวข้าวที่มีสารสกัดจากพืช

จากการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียโดยแบคทีเรียลเซลลูโลสจากน้ำข้าวข้าวที่มีสารสกัดจากพืช 8 ชนิด ได้แก่ กระจ่างดำ (*Kaempferia parviflora*), กระจ่างเพชร (*Opuntia ficus-indica*), พริก (*Capsicum frutescens*), กระจ่าง (Boesenbergia rotunda), กระจ่างเทียม (*Allium sativum* Linn.), เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.), ดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) และ ใบย่านาง (*Tiliacora triandra*) โดยใช้แบคทีเรียแกรมบวกสองสายพันธุ์ (*B. cereus* และ *S. aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบหนึ่งสายพันธุ์ (*E. coli*) ซึ่งพิจารณาจากขนาดของวงใสการยับยั้ง เมื่อทดสอบด้วยการตัดแปลงวิธี Agar disc diffusion แสดงตารางที่ 3 และ ภาพที่ 10, 11 และ 12 พบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสจากน้ำข้าวข้าวที่มีสารสกัดจากดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus*, *E. coli* และ *S. aureus* มีขนาดวงใสการยับยั้งเท่ากับ 8.61, 12.25 และ 0.60 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดจากพริก (*Capsicum frutescens*), กระจ่าง (Boesenbergia pandurata) และใบย่านาง (*Tiliacora triandra*) สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* และ *E. coli* สารสกัดจากกระจ่างเพชร (*Opuntia ficus-indica*) และกระจ่างเทียม (*Allium sativum* Linn.) สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus*, และ *S. aureus* ขณะที่กระจ่างดำ (*Kaempferia parviflora*) และเปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) สามารถยับยั้งการเจริญได้เพียง *B. cereus* และ *E. coli* ตามลำดับ และจากการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียโดยแบคทีเรียลเซลลูโลสจากน้ำข้าวข้าวที่มีสารสกัดจากพืช 8 ชนิด พบว่า *S. aureus* สามารถทนต่อการยับยั้งโดยสารสกัดจากพืชมากที่สุด และ *E. coli* ตามลำดับ

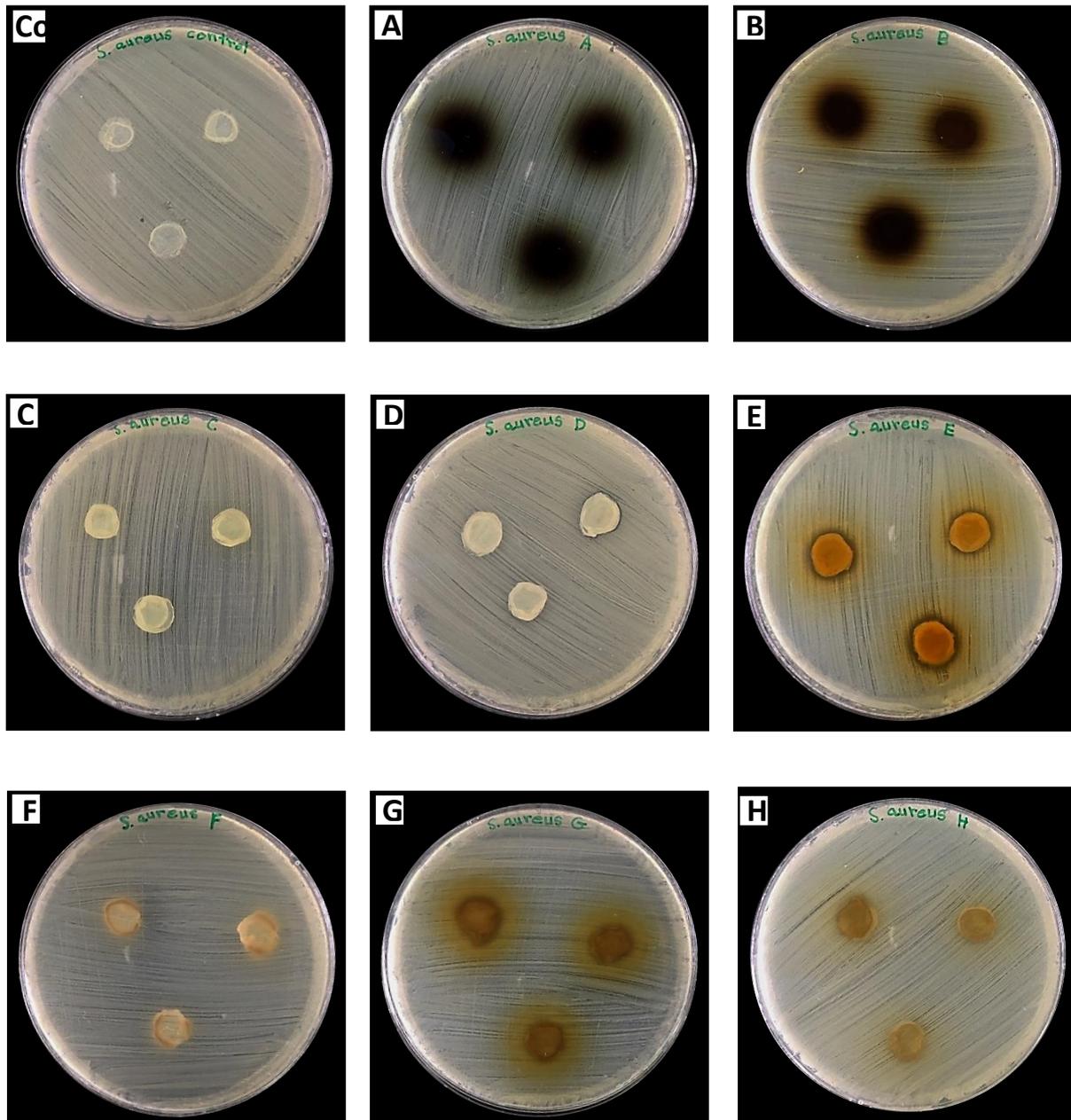
ตารางที่ 3 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยแบคทีเรียลเซลลูโลสจากน้ำข้าวข้าวที่มีสารสกัดจากพืช

ชนิดของพืช	ขนาดวงใสของการยับยั้งการเจริญ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, มิลลิเมตร)		
	<i>B. cereus</i> *	<i>E. coli</i> *	<i>S. aureus</i> *
กระจ่างดำ ( <i>Kaempferia parviflora</i> )	8.14 ± 0.092	0	0
กระจ่างเพชร ( <i>Opuntia ficus-indica</i> )	2.04 ± 0.849	0	0.57 ± 0.580
พริก ( <i>Capsicum frutescens</i> )	11.78 ± 1.648	11.22 ± 0.915	0
กระจ่าง ( <i>Boesenbergia pandurata</i> )	8.71 ± 0.535	14.53 ± 1.450	0
กระจ่างเทียม ( <i>Allium sativum</i> Linn.)	7.63 ± 0.549	0	2.96 ± 1.697
เปลือกมังคุด ( <i>Garcinia mangostana</i> L.)	0	12.25 ± 1.721	0
ดาวเรือง ( <i>Tagetes erecta</i> L.)	8.61 ± 1.094	12.25 ± 3.706	0.60 ± 0.779
ใบย่านาง ( <i>Tiliacora triandra</i> )	11.49 ± 0.782	9.23 ± 0.621	0

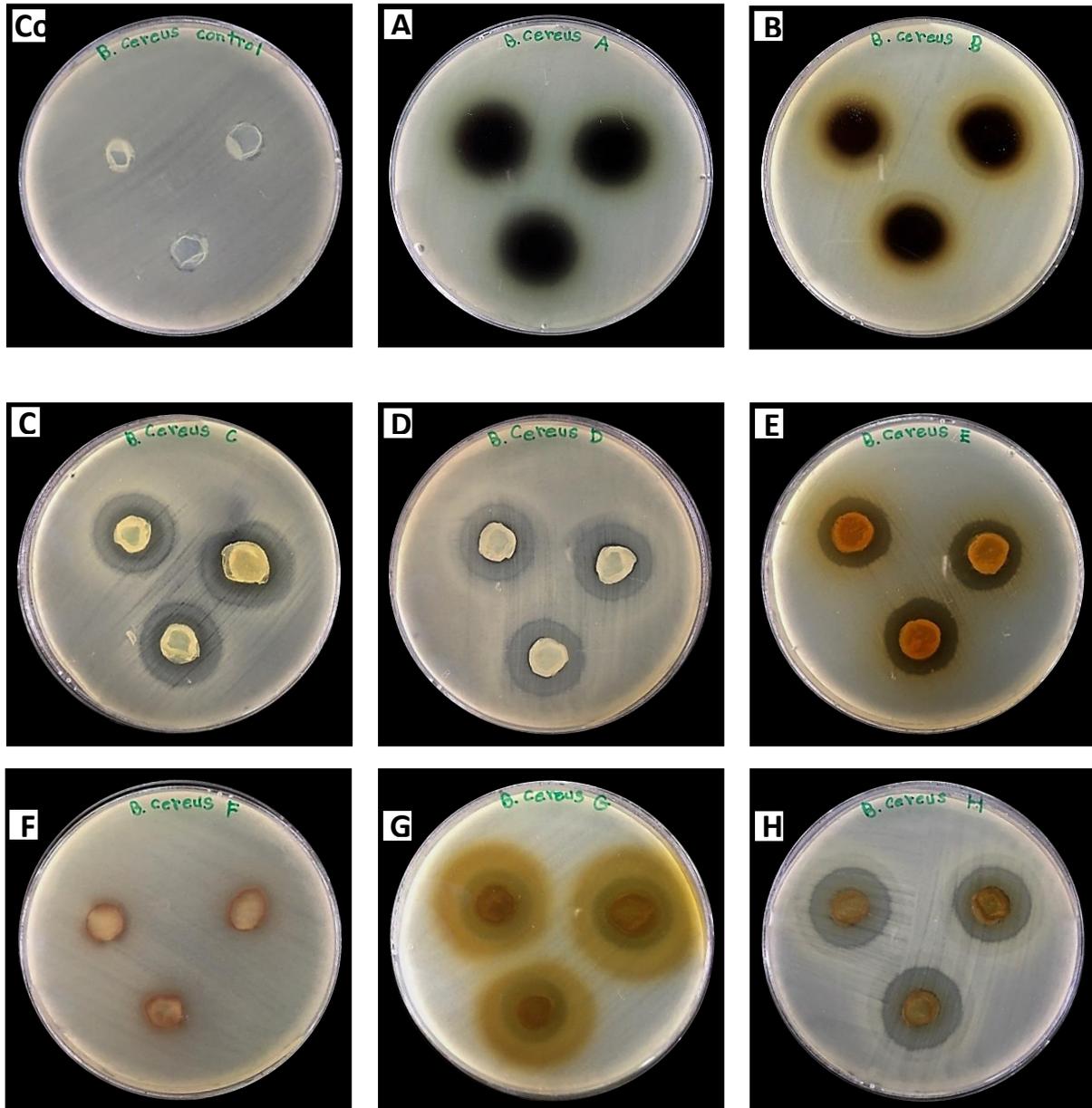
\*ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 10 ฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Escherichia coli* โดยแบคทีเรียเซลลูโลสที่มีสารสกัดกระชายดำ (A), กระบองเพชร (B), พริก (C), กระชาย (D), กระเทียม (E), เปลือกมังคุด (F), ดาวเรือง (G) และใบย่านาง (H) ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียเซลลูโลสในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Co)



ภาพที่ 11 ฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* โดยแบคทีเรียเซลลูโลสที่มีสารสกัดกระชายดำ (A), กระบองเพชร (B), พริก (C), กระชาย (D), กระเทียม (E), เปลือกมังคุด (F), ดาวเรือง (G) และใบอย่างนาง (H) ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียเซลลูโลสในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Co)



ภาพที่ 12 ฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Bacillus cereus* โดยแบคทีเรียลเซลลูโลสที่มีสารสกัดกระชายดำ (A), กระบองเพชร (B), พริก (C), กระชาย (D), กระเทียม (E), เปลือกมังคุด (F), ดาวเรือง (G) และใบย่านาง (H) ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียลเซลลูโลสในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Co)

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้ในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง พบว่ามีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยแบคทีเรียเซลลูโลสเท่ากับ 31 นาโนเมตร มีดัชนีความเป็นผลึกมีค่าประมาณ 72 เปอร์เซ็นต์ จุดหลอมเหลว 140.33 องศาเซลเซียส เมื่อนำแผ่นฟิล์มแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียเซลลูโลสจากน้ำข้าวข้าวที่มีในซินสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* and *S. aureus* ได้ ในขณะที่แบคทีเรียเซลลูโลสจากน้ำข้าวข้าวที่มีสารสกัดจากดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus*, *E. coli* และ *S. aureus* ได้ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า น้ำข้าวข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีต้นทุนต่ำ เพื่อผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้ และสามารถนำไปพัฒนาเป็นแผ่นฟิล์มบรรจุภัณฑ์แอคทีฟ ก็มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรบบางชนิดได้

## เอกสารอ้างอิง

- นุชนาฏ เลี้ยงอำนวนาย และ พิมพ์ชนก จตุรพิริย์. 2562. การแยกและการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ:แบคทีเรียเซลลูโลสจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแปง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์. มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม. บุชกร ทองใบ. การผลิตฟิล์มที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จากน้ำมะพร้าว. สารวิจัยเพื่อชุมชน : ปีที่ 1 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม – สิงหาคม 2555. 75-83
- ศรัณยู อุ๋นทวี และ ชนัญ ผลประไพ. การประยุกต์ใช้สารประกอบเซลลูโลสจากแบคทีเรียกับพอลิเมอร์ธรรมชาติเพื่อผลิตแผ่นฟิล์มในการประชุมเครือข่ายวิชาการบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 1. 18 ธันวาคม 2555 มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- 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.
- 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.
- 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.
- Iguchi, M., Yamanaka, S. and Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose—a masterpiece of nature’s arts. *Journal of Materials Science*, 35(2): 261–270.
- Johnson, D. C. and Neogi, A. N. (1989). Sheeted products formed from reticulated microbial cellulose. Us Patent US4863565, 1989/09/05.
- 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.
- Lin S, Liu C, Hsu K, Hung Y, Shih T, Cheng K. (2016). Production of bacterial cellulose with various additives in a PCS rotating disk bioreactor and its material property analysis. *Cellulose*. 367-377.
- 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.

- 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.
- Sheykhnazari, S., Tabarsa, T., Ashori, A., Shakeri, A. and Gosalipour, M. (2011). Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1187-1191.
- Yamanaka, S. and Watanabe, K. (1994). Applications of bacterial cellulose in cellulosic polymers. In: Gilbert R (ed) Hanser Publishers Inc, Cincinnati
- 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: 219–224.
- Yoskantho, B., Leksakul, K., Taboonthong, M. and Chaisakoo W. (2012). Properties of Bacterial Cellulose for Producing Biodegradable Pots. Chiang Mai University.

**ภาคผนวก**  
**การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี**

**อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำข้าวข้าว (WWR)**

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

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

## ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย) นางพิมพ์ชนก จตุรพิริย์  
(ภาษาอังกฤษ) Mrs Phimchanok Jaturapiree
2. วัน เดือน ปีเกิด 2 ตุลาคม 2518
3. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3 7109 00036 31 0
4. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
5. สถานที่ทำงาน  
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม  
มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม 73000  
โทรศัพท์ 0-3430-0463, 089-1204518 โทรสาร 0-3430-0463  
e-mail phimchanok@hotmail.com
6. ประวัติการศึกษา
 

ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีที่จบ พ.ศ. 2539
ปริญญาโท	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขา วิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่จบ พ.ศ. 2543
ปริญญาเอก	Dr.nat.tech. สาขา วิศวกรรมชีวเคมี University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria ปีที่จบ พ.ศ. 2549
7. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา
  - ระดับปริญญาโท
 

ชื่อเรื่อง	“Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production from <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB 11599 by two stage continuous fermentation”
ปีที่ดำเนินการ	2542-2543
  - ระดับปริญญาเอก
 

ชื่อเรื่อง	“Development of a process for the hydrolysis of the milk sugar lactose employing novel extremophilic enzymes”
ปีที่ดำเนินการ	2547-2549
8. ความเชี่ยวชาญ Biochemical Engineering, Fermentation Process , Enzyme Technology

## 9. ประสบการณ์งานวิจัย

- **Phimchanok Nakkharat** and Dietmar Haltrich, (2006) Purification and characterisation of an intracellular enzyme with beta-glycosidase and beta-galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. *Journal of Biotechnology*. 123: 304-313.
- **Phimchanok Nakkharat** and Dietmar Haltrich, (2006) Lactose hydrolysis and formation of galactooligosaccharides by a novel immobilized beta-galactosidase from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 129-132: 215-225.
- **Phimchanok Nakkharat**, Montarop Yamabhai, Klaus D. Kulbe and Dietmar Haltrich, (2006) Formation of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis by a novel beta-galactosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Biotechnology Journal*. 1: 633-638.
- **Phimchanok Nakkharat** and Dietmar Haltrich (2007) Beta-Galactosidase from *Talaromyces thermophilus* immobilized on to Eupergit C for production of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis in batch and packed-bed reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23: 759-764.
- **Phimchanok Nakkharat**, Arkom Tesnum, Arkira Maethawarakorn Dietmar Haltrich and Chirakarn Muangnapoh. (2008) Characterization of a Crude Thermostable beta-galactosidase by the Bacterium PD1 Isolated from the Pong Dueat Hot Spring. *Kasert Journal (Nat. Sci.)* 42: 264-268.
- Somyos Osiriphun and **Phimchanok Jaturapiree**. (2009) Isolation and characterization of beta-galactosidase from the thermophile B1.2. *As. J. Food Ag-Ind.* 135-143.
- Chantawongvuti, R., J. Veerajetbodithat, **P. Jaturapiree** and C. Muangnapoh (2010) Immobilization of *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 on Loofa Sponge Coated with Chitosan for Lactic Acid Fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(1), 110–116.
- Witsanu Srila, Budsaraporn Ngampanya and **Phimchanok Jaturapiree**. (2011) Cloning of Beta-Galactosidase Gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892 and Expression in *Escherichia coli*. *Thai Journal of Agricultural Science*. 44 (5): 471-476.
- **Phimchanok Jaturapiree**, Suganya Phuengjayaeam, Porntip Seangsawang, Witsanu Srila and Chirakarn Muangnapoh. (2012) Isolation and Production of Novel Beta-galactosidase

from a Newly Isolated, Moderate Thermophile, *Bacillus* sp. Strain B1.1 Journal of Food Science and Engineering 2: 395-402.

- Sathita Phol-in, Donlaya Kamkalong, Adisak Jaturapiree and **Phimchanok Jaturapiree**. (2012) Poly (3-hydroxybutyrate) production from glycerol by marine microorganisms. KKU Research Journal. 17(4): 573-579.
- ชุติมา วันเพ็ญ, บุชราภรณ์ งามปัญญา, สุวัฒนา พฤกษ์ศรี, พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ และ ปราโมทย์ คูวิจิตร จารุ. (2556) ผลของการพรีทรีตเมนต์ด้วยอัลตราซาวด์ต่อการสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 36(2): 249-258.
- Ratthadaporn Phathiphotikun, Phakphimol Piwpan, Adisak Jaturapiree and **Phimchanok Jaturapiree**. (2014) Polyhydroxybutyrate(PHB) production by *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 from low-cost substrate as carbon source. KKU Research Journal. 19 (Supplement Issue): 53-59.
- Hemmaratchirakul, J., **Jaturapiree, P.**, Prueksasri, S. and Wichienchot, S. (2015). "Production of galactooligosaccharide by  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* BFP32." *International Food Research Journal*. 22(6): 2550-2557.
- Kaenpanao, P., Piwpan, P. and **Jaturapiree, P.** (2016). "Prebiotic Fructooligosaccharide Production from Yeast Strain ML1." *International Food Research Journal*. 23(1): 425-428.
- Piyarat Nuwan, Phakphimol Piwpan, Adisak Jaturapiree and **Phimchanok Jaturapiree**. (2016). Production of dextran by *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053 in fed batch fermentation. KKU Res.j.. 22(1): 366-375.
- Phakphimol Piwpan, Adisak Jaturapiree and **Phimchanok Jaturapiree**. (2016). Isolation and production of polyhydroxybutyrate (PHB) from isolated strain *Bacillus* sp. using crude glycerol as a carbon source. KKU Res.j.. 22(1): 376-384.
- Ngampanya, B., Keayarsa, S., **Jaturapiree, P.**, Prakobpran, P. and Wichienchot, S. (2016). Characterization of transfructosylating activity enzyme from tubers of tropical Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for production of fructooligosaccharides. *International Food Research Journal* 23(5): 1965-1972.
- Wichienchot, S., Hemmaratchirakul, J., **Jaturapiree, P.** and Prueksasri, S. (2016). Evaluating prebiotic property of galactooligosaccharide produced by *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* BFP32 in fecal batch culture. *International Food Research Journal* 23(5): 2241-2248.

- Wichienchot, S., Prakobpran, P., Ngampanya, B. and **Jaturapiree, P.** (2017). Production, purification and fecal fermentation of fructooligosaccharide by FTase from Jerusalem artichoke. *International Food Research Journal* 24(1): 134-141.
- อติศักดิ์ จตุรพิริย์, เอกราชนย์ ไชยชนะ, ธัญญา เสาวภาคย์, บงกช ชื่นประไพ และ **พิมพ์ชนก จตุรพิริย์.** (2562) การผลิตและคุณลักษณะของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตด้วย *Acetobacter xylinum* TISTR 975 จากน้ำคั้นเปลือกสับปะรด. วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร ปีที่ 13 ฉบับที่ 1 มกราคม-มิถุนายน 2562. 180-192.
- Pipat Sudyang, Nuchanat Laingamnuay and **Phimchanok Jaturapiree.** (2019) Production and Characterization of Bacterial Cellulose from Rice Washing Drainage (RWD) by *Komagataeibacter nataicola* Li1. *Key Engineering Materials*. Vol. 824, 30-37.

## การเผยแพร่ผลงานวิจัย

1. Pipat Sudyang and **Phimchanok Jaturapiree**. (2019) Antimicrobial Activity of a Nisin-Containing Bacterial Cellulose Film from Rice Washing Drainage. The 45th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 45). 7-9 October 2019. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand. Page 77-81 (Poster+Proceeding)
2. Pipat Sudyang, Nuchanat Laingamnuay and **Phimchanok Jaturapiree**. (2019) Production and Characterization of Bacterial Cellulose from Rice Washing Drainage (RWD) by *Komagataeibacter nataicola* Li1. Key Engineering Materials. Vol. 824, 30-37.