



รายงานการวิจัย เรื่อง

การแยกและการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ : แบคทีเรียเซลลูโลส จากน้ำทิ้งของ
โรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง

Isolation and screening of microorganisms producing biopolymer production : bacterial
cellulose from starchy waste water

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวนุชนาฏ เลี้ยงอำนาจ (หัวหน้าโครงการ)
รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ (ผู้ร่วมวิจัย)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์
มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2563

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2562 จากสำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ และได้รับการสนับสนุน จาก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

ชื่อโครงการ	การแยกและการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ : แบคทีเรียลเซลลูโลส จากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง
ชื่อผู้วิจัย	1. นางสาวนุชนาฏ เลี้ยงอำนาจ (หัวหน้าโครงการ) คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร 2. รศ.ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ (ผู้ร่วมวิจัย) คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร
แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย	งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2562 สำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีที่เสร็จ	พ.ศ. 2563
ประเภทการวิจัย	การพัฒนาการทดลอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

แบคทีเรียลเซลลูโลส เป็นผลิตภัณฑ์ได้จากแบคทีเรียบางชนิด มีความบริสุทธิ์สูง มีประสิทธิภาพสำหรับนำไปใช้ในทางการแพทย์และในอุตสาหกรรมต่าง ๆ งานวิจัยนี้คัดแยกแบคทีเรียผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากผลไม้ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Yeast Extract (YE) และ Schramm and Hestrin (SH) ตลอดจน ประเมินสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยใช้น้ำข้าวข้าว (water from washing rice; WWR) ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ Li1 คัดแยกได้จากแอปเปิ้ล (*Malus pumila*) ถูกจำแนกเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง YE ได้มากกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง SH ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร พีเอช 4.5 และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 13 วัน

คำสำคัญ : แบคทีเรียลเซลลูโลส พอลิเมอร์ชีวภาพ น้ำทิ้งประเภทแป้ง

Research Title	Isolation and screening of microorganisms producing biopolymer production : bacterial cellulose from starchy waste water
Researcher	1. Miss Nuchanat Laingamnuay (Project Leader) Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University 2. Assoc. Prof. Dr. Phimchanok Jaturapiree (Co-Researcher) 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

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 Yeast Extract (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. 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 50 mL of WWR-based medium at 4 g/L of total sugar were found to be 5% (v/v) inoculum at initial pH 4.5 for 13 days of incubation.

Key words : Bacterial cellulose, Biopolymer, 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	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง	19
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	32
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	38
ประวัติผู้วิจัย	48
การเผยแพร่ผลงานวิจัย	53

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. โครงสร้างของแบคทีเรียเซลลูโลสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิด	5
2. แบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน	8
3. แหล่งที่มาของน้ำขาวข้าว	20
4. ชนิดผลไม้และแหล่งที่มาของผลไม้ที่นำมาคัดแยกเชื้อผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส	23

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ลักษณะโครงสร้างโดยรวมของแบคทีเรียลเซลลูโลส	4
2. โครงสร้างของ Cellulose I และ Cellulose II	5
3. วิธีของกระบวนการเมทาบอลิซึมของ <i>A. xylinum</i> ในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส	10
4. โครงสร้างของ cyclic diguanylic acid (c-di-GMP)	11
5. โมเดลการควบคุมการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของ <i>A. xylinum</i>	11
6. ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) (a) และความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) (b) ของน้ำข้าวข้าวจากแหล่งที่มาต่าง ๆ	21
7. การตัดแยกเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากแอปเปิ้ล	25
8. ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. Nataicola</i> ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	28
9. ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. Nataicola</i> ในอาหาร WWR ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	29
10. พีเอชต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. Nataicola</i> ในอาหาร WWR ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	30
11. ความเข้มข้นกลูต้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย <i>K. Nataicola</i> ในอาหาร WWR พีเอชเท่ากับ 4.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง	31

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

แบคทีเรียเซลลูโลส (Bacterial cellulose) เป็นเส้นใยนาโนพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 นาโนเมตร ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสประมาณ 2,000-18,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า (1-4) ไกลโคซิดิก ซึ่งเกิดจากสังเคราะห์ของแบคทีเรียบางชนิด โดยเซลลูโลส (cellulose) ที่มาจากแบคทีเรียจะมีคุณสมบัติแตกต่างจากเซลลูโลสที่ได้จากพืชและผลไม้ เช่น มีเส้นใยขนาดเล็กกว่าเส้นใยจากพืชชั้นสูง และเมื่อเทียบกับเส้นใยสังเคราะห์ประมาณ 10-1,000 เท่า และ 100 เท่า ตามลำดับ มีความบริสุทธิ์สูง ไม่มีการเจือปนของเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) และเพกทิน (pectin) เหมือนเซลลูโลสที่ได้จากพืชและผลไม้ และมีความเป็นผลึกสูง ซึ่งในกระบวนการสกัดเซลลูโลสทั้งจากพืชและผลไม้ จะต้องใช้กรรมวิธีทางเคมีในการกำจัดสารลิกนิน และการฟอกสีเซลลูโลส ทำให้ต้องใช้สารเคมีและพลังงานจำนวนมาก ส่งผลกระทบโดยตรงต่อสิ่งแวดล้อม ประกอบกับในปัจจุบันจำนวนป่าไม้ลดลงอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดปัญหาขาดแคลนแหล่งวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลสที่มาจากพืช และเมื่อมีการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม พบว่าเกิดปัญหาหลายด้าน เช่น ราคาของวัตถุดิบที่ไม่แน่นอนขึ้นกับสถานะของตลาด รวมทั้งบางครั้งคุณภาพของวัตถุดิบก็ไม่ใช่ไปตามต้องการ ในการผลิตเซลลูโลสแบบดั้งเดิมจะใช้น้ำตาล เช่น กลูโคส (glucose), ฟรุกโตส (fructose) และซูโครส (sucrose) เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) จึงมีความพยายามเป็นอย่างยิ่งในการหาแหล่งคาร์บอนราคาถูกเพื่อผลิตเซลลูโลสจากแหล่งอื่นๆ เช่น น้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษ เศษอาหาร และน้ำเสียหลักจากการหมักไขมัน (Huang และคณะ, 2010) เป็นต้น ซึ่งล้วนแล้วเป็นของเสียที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม หากปล่อยสู่ธรรมชาติโดยไม่ได้รับการบำบัด อีกทั้งคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physicochemical) ของแบคทีเรียเซลลูโลสดังที่กล่าวไว้ข้างต้น จึงมีความน่าสนใจเพื่อเป็นวัสดุทางเลือกใหม่สำหรับทดแทนพลาสติกในบางอุตสาหกรรมและนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด เช่น ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกและกระดูกอ่อน, การซ่อมแซมเนื้อเยื่อ, เส้นเลือดเทียม และจอภาพอิเล็กทรอนิกส์ เป็นต้น

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความคิดในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสพร้อมทั้งแก้ไขปัญหาล้างแ้วดล้อมไปด้วย โดยการนำทิ้งประเภทแป้ง (starchy wastewater) มาใช้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส ซึ่งได้มาจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น โรงงานผลิตแป้งสำหรับประกอบอาหาร โรงงานขนมจีน เป็นต้น รวมทั้งน้ำข้าวข้าว (water from washing rice) ซึ่งเป็นน้ำที่ได้จากการล้างข้าว ซึ่งหากปล่อยลงสู่แม่น้ำจะทำให้แม่น้ำเน่าเสียและยังเป็นการลดต้นทุนการผลิต อีกทั้งยังได้ใช้ความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยในกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้แบคทีเรียเซลลูโลสที่สามารถนำไปประยุกต์ในงานด้านต่างๆ ได้ และสุดท้ายยังสามารถช่วยลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

1. คัดแยกเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูโลสจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูโลสจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง

1.3 ขอบเขตในการศึกษา

1. คัดแยกเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูโลสจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเซลล์ูโลสจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้งโดยศึกษาปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของแหล่งอาหาร สัดส่วนของกล้าเชื้อ และเวลาที่ใช้ในการผลิต เป็นต้น

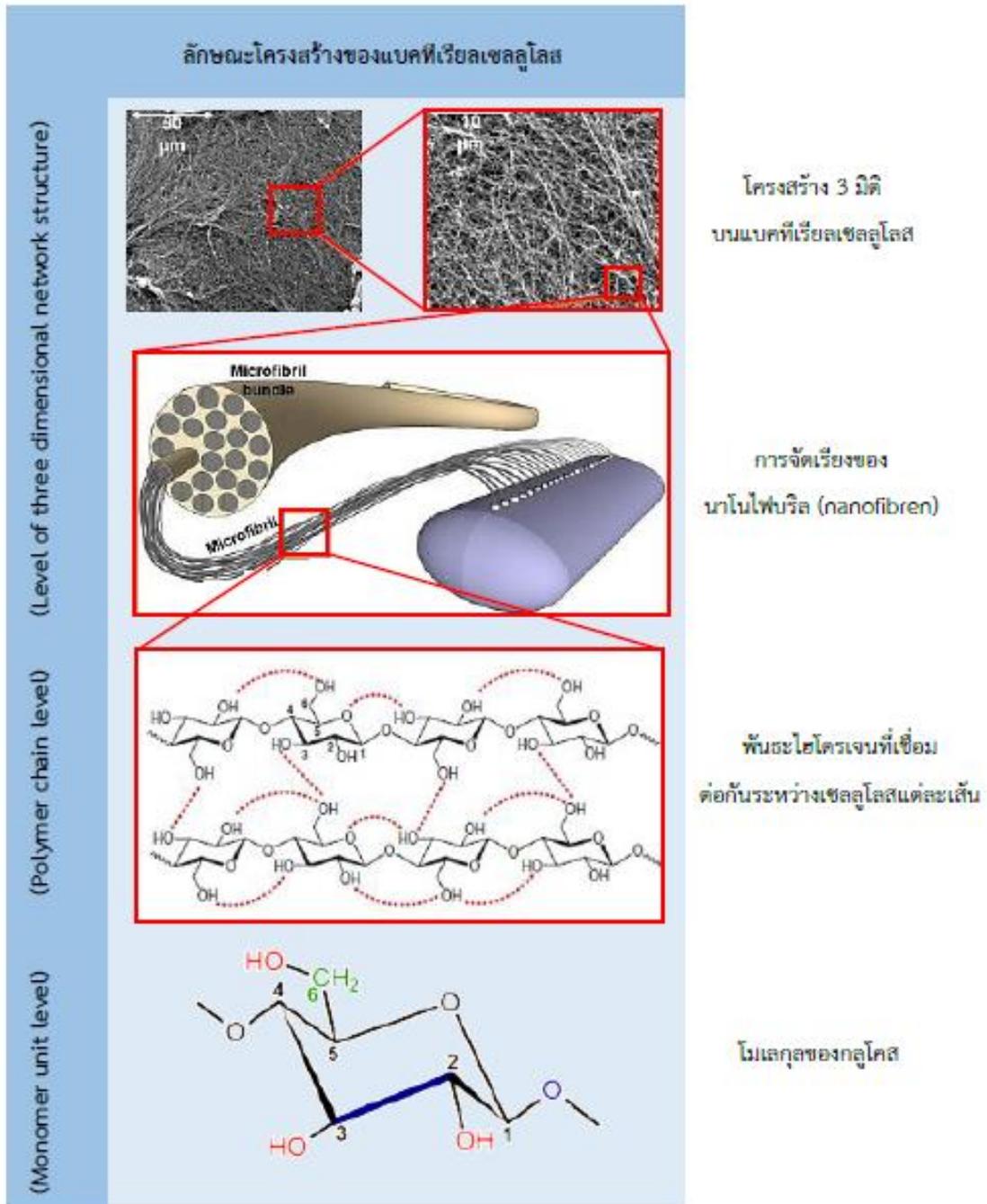
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียเซลลูโลส (bacterial cellulose)

แบคทีเรียเซลลูโลสเป็นสารชีวโมเลกุลประเภทคาร์โบไฮเดรตชนิดโฮโมโพลีแซคคาไรด์เชิงเส้น มีลักษณะเป็นโฮโมพอลิเมอร์ที่ไม่มีกิ่งก้าน (unbranched) ประกอบไปด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะปีตา (1,4) ไกลโคซิดิก ซึ่งผลิตได้จากแบคทีเรียบางสายพันธุ์ (Bodin และคณะ, 2011) มีค่า Degree of polymerization (DP) อยู่ในช่วงระหว่าง 2000-6000 (Jonas และ Farah, 1998) แต่ในบางครั้งอาจพบอยู่ในช่วงระหว่าง 16,000-20,000 (Watanabe และคณะ, 1998) โมเลกุลของเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นยาว แต่ละเส้นเรียงขนานกันและเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจน รวมกันเป็นมัดมีลักษณะเป็นเส้นใยเล็กๆ เรียกว่า ไฟบริล (fibril) (Ul-Islam และคณะ, 2012) โดยทั่วไปจะไม่พบเซลลูโลสที่เรียงตัวเป็นเส้นเดี่ยวแต่จะพบเซลลูโลสลักษณะเป็นกลุ่มเรียงตัวขนานและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของโมเลกุลหนึ่งกับออกซิเจนอะตอมที่อยู่ในวงแหวนของโมเลกุลอื่นอย่างมีระเบียบเรียกว่า ผลึกไมเซล (crystalline micelle) แต่ละไมเซลประกอบด้วยโมเลกุลของเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุล มีลักษณะรูปร่างเป็นริบบินหนาในรูปไมโครไฟบริล (microfibril) แสดงดังภาพที่ 1 มีลักษณะเป็นพาราเจล (paragel) หมุนไปทางซ้าย ซึ่งจะเกิดจากการเรียงตัวของไมเซลประมาณ 10-20 ไมเซล หรือทับกับเป็นเกลียวรอบแกนของเส้นใยโดยมีพันธะไฮโดรเจน 2 ตำแหน่ง ในแต่ละเส้นสายของเซลลูโลส คือ ระหว่างออกซิเจนตำแหน่งที่ 6 ของน้ำตาลกลูโคสกับหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ตำแหน่งที่ 2 ของน้ำตาลกลูโคสโมเลกุลใกล้เคียงกัน และระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนในวงแหวนอื่น

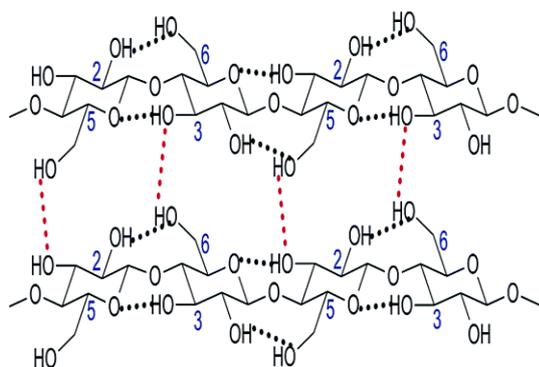
โครงสร้างของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง และในสภาวะที่มีการกวนจากการวิเคราะห์โดยใช้การหักเหรังสีเอกซ์ (X-ray) พบว่ามีผลึก 2 รูปแบบ คือ cellulose I (ribbon-like polymer) และ cellulose II (thermodynamically stable polymer) แสดงดังภาพที่ 2 (Chawla และคณะ, 2009) แบคทีเรียเซลลูโลมีโครงสร้างแบบ cellulose I เป็นองค์ประกอบหลักประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากโครงสร้างของพืชชั้นสูงที่เป็นแบบ cellulose II ซึ่งจะมีความแข็งแรงกว่า cellulose I โครงสร้างทั้งสองแบบนี้จะพันกันเป็นเกลียว (ribbon) รวมตัวกันเป็นเส้นใยไมโครไฟบริลที่มีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งมีขนาดความกว้าง 70-80 นาโนเมตร และหนา 3-4 นาโนเมตร ในขณะที่เส้นใยเซลลูโลสที่ได้มาจากพืชชั้นสูงใหญ่กว่า 10-1000 เท่า แต่โครงสร้างทางโพลิเมอร์ของแบคทีเรียเซลลูโลสจะขึ้นอยู่กับสารสังเคราะห์และกลไกการควบคุมของจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 1 (Jonas และ Farah, 1998) เซลลูโลสที่สร้างขึ้นมีหน้าที่ปกป้องและรักษาระดับน้ำและออกซิเจนภายในเซลล์ (Cook และ Covin, 1980)



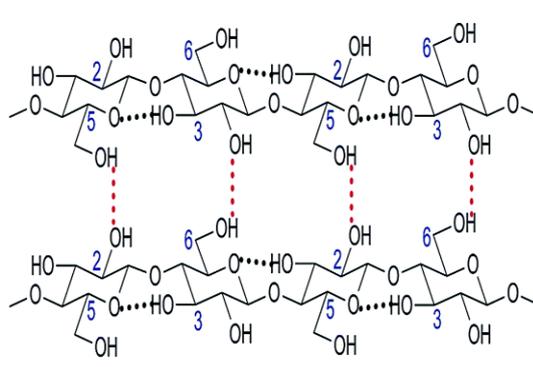
ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างโดยรวมของแบคทีเรียเซลลูโลส (ดัดแปลงมาจาก Sulaeva และคณะ, 2015)

ตารางที่ 1 โครงสร้างของแบคทีเรียเซลลูโลสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิด (ดัดแปลงมาจาก Jonas และ Farah, 1998)

สกุล (Genus)	โครงสร้างเซลลูโลส (Cellulose structure)
<i>Acetobacter</i>	เป็นแผ่นที่เกิดจากเส้นใย
<i>Achromobacter</i>	เส้นใย
<i>Aerobacter</i>	เส้นใย
<i>Agrobacterium</i>	เส้นใยสั้นๆ
<i>Alcaligenes</i>	เส้นใย
<i>Pseudomonas</i>	เส้นใยบางๆ
<i>Rhizobium</i>	เส้นใยสั้นๆ
<i>Sarcina</i>	ไม่มีรูปร่างแน่นอน
<i>Zoogloea</i>	ไม่ทราบแน่ชัด



Cellulose I



Cellulose II

ภาพที่ 2 โครงสร้างของ Cellulose I และ Cellulose II (Credou และ Berthelot, 2014)

โดยทั่วไปองค์ประกอบทางเคมีของแบคทีเรียเซลลูโลสประกอบด้วย ไชมัน น้ำ สารเยื่อใย โปรตีน เถ้า และคาร์โบไฮเดรต 0.06, 94.6, 1.15, 0.84, 0.10, และ 3.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Guzman และคณะ, 1982) นอกจากนี้ยังพบแร่ธาตุต่างๆ ประกอบด้วยแคลเซียม ฟอสฟอรัส และไนอาซีน 0.520 0.570 และ 0.022 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (สมคิด ธรรมรัตน์, 2530) แบคทีเรียเซลลูโลสสามารถละลายได้ในสารละลาย กรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยกรดจะไปย่อยสลายพันธะไฮโดรเจนของแบคทีเรียเซลลูโลส แต่จะไม่ละลายในน้ำเดือด ในสารละลายที่เป็นต่าง แอลกอฮอล์ และอะซิโตน

2.2 แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางโครงสร้างของแบคทีเรียเซลลูโลส พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางโครงสร้างเหมือนกับเซลลูโลสที่มาจากพืช แม้ว่าจะสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และสาหร่าย โดยในสาหร่ายจะพบในสาหร่ายสีเขียวซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) และไซแลน (xylan) ซึ่งอาจจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ และในสาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta) พบในปริมาณน้อย ส่วนใหญ่จะพบในสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) และสาหร่ายสีทอง (Chrysophyta (Chrysophytes)) (Occurrence, 1991) เชื้อราจะพบอยู่ในผนังเซลล์ชั้นในเชื่อมกันด้วยพันธะ β -1,3 หรือ β -1,6 D-glucan คิดเป็นประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักผนังเซลล์แห้ง (Isizawa, 1976) ส่วนแบคทีเรียจะพบทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Dickeya* และ *Rhodobacter* (Brown, 2004; Deinema และ Zevenhuizen, 1971; Morgan และคณะ, 2013; Jahn และคณะ, 2011) ซึ่งจากการศึกษา พบว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสสูงสุดคือ *A. xylinum* (Brown, 1987; Gromet-Elhanan และคณะ, 1963; Geyer และคณะ, 1994a, b) *A. hansenii* (Jung และคณะ, 2005; Park และคณะ, 2003) และ *A. pasteurianus* (Yoshino และคณะ, 1996)

Acetobacter xylinum (*A. xylinum*) เป็นแบคทีเรียในวงศ์ *Acetobacteraceae* ประกอบด้วย 6 สกุล คือ *Acetobacter*, *Acidomona*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* และ *Kozakia* *A. xylinum* ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) เซลล์มีลักษณะรูปร่างรีจนถึงเป็นท่อนตรงหรือโค้ง ขนาดของเซลล์กว้างประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน ยาวประมาณ 1.0-4.0 ไมครอน เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลารอบเซลล์หรือแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ โคโลนีของ *Acetobacter* sp. มีสีชมพูเนื่องจากการสังเคราะห์สารพอร์ไพรีนส์ ไม่

สร้างสปอร์ (non spore forming bacteria) เจริญได้ในที่มีอากาศ (aerobic bacterial) สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติก ออกซิไดซ์กรดอินทรีย์ประเภทอะซิเตท และแลคเตทเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non pathogen) *A. xylinum* เป็นแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการศึกษากระบวนการสังเคราะห์ขั้นพื้นฐานและนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์สำหรับการผลิตเซลลูโลส เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสที่ค่อนข้างสูงประมาณ 1.0 - 4.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จากการเพาะเลี้ยง (Okiyama และคณะ, 1992) และยังสามารถเจริญได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ดังแสดงตารางที่ 2

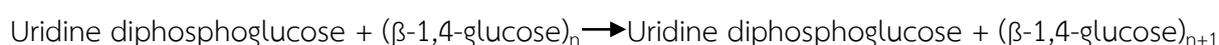
การเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้อยู่ในสภาวะที่มีชีวิตรอด มีคุณสมบัติเหมือนเดิม ไม่มีเกิดการปนเปื้อน เพื่อใช้ปฏิบัติงานในครั้งต่อไป ได้อย่างมีประสิทธิภาพเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง เนื่องจากจะช่วยลดระยะเวลาจัดหายาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ต้องการ โดยทั่วไปจะใช้วิธีการเก็บรักษาการแตกต่างกัน เช่น การแช่แข็งในกลีเซอรอลหรือไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO) และการเก็บในรูปแบบแห้งเป็นผง จากการศึกษาของ Wiegand และ Klemm (2006) พบว่าการเก็บ *A. xylinum* โดยการแช่แข็งในกลีเซอรอลจะส่งผลต่อโครงสร้างของเซลลูโลสที่ผลิตได้ และส่งผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย และการแช่แข็งใน DMSO พบว่าแบคทีเรียมีอัตราการรอดตายสูงและไม่ส่งผลต่อโครงสร้างของเซลลูโลสที่ผลิตแบคทีเรีย ส่วนการเก็บในรูปแบบแห้ง พบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างของเซลลูโลส แต่แบคทีเรียมีอัตราการรอดตายที่ต่ำ

ตารางที่ 2 แบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ต่างกัน (ดัดแปลงมาจาก Chawla และคณะ, 2009)

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	องค์ประกอบเพิ่มเติม	ระยะเวลาเพาะเลี้ยง	ผลได้ (g/l)
<i>A. xylinum</i> BRC 5	กลูโคส	เอทานอลและออกซิเจน	50 ชั่วโมง	15.30
<i>G. hansenii</i> PJK (KCTC 10505 BP)	กลูโคส	ออกซิเจน	48 ชั่วโมง	1.72
<i>G. hansenii</i> PJK (KCTC 10505 BP)	กลูโคส	เอทานอล	72 ชั่วโมง	2.50
<i>Acetobacter</i> sp. V6	กลูโคส	เอทานอล	8 วัน	4.16
<i>Acetobacter</i> sp. A9	กลูโคส	เอทานอล	8 วัน	15.2
<i>A. xylinum</i> BPR2001	กากน้ำตาล	ไม่มี	72 ชั่วโมง	7.82
<i>A. xylinum</i> BPR2001	ฟรุกโตส	วุ้นและออกซิเจน	72 ชั่วโมง	14.10
<i>A. xylinum</i> BPR2001	ฟรุกโตส	วุ้น	56 ชั่วโมง	12.00
<i>Acetobacter xylinum</i> ssp. <i>sucrofermentans</i> BPR2001	ฟรุกโตส	ออกซิเจน	52 ชั่วโมง	10.40
<i>Acetobacter xylinum</i> ssp. <i>sucrofermentans</i> BPR2001	ฟรุกโตส	วุ้นและออกซิเจน	44 ชั่วโมง	8.70
<i>Acetobacter xylinum</i> E25	กลูโคส	ไม่มี	7 วัน	3.34
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> IFO 13773	กลูโคส	ลิโนซิลโฟเนต	7 วัน	10.1
<i>Acetobacter xylinum</i> NUST4.1	กลูโคส	โซเดียมอัลจิเนต	5 วัน	6.00
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> IFO 13773	กากน้ำตาล	ไม่มี	7 วัน	5.76
<i>Lactobacillus mali</i> JCM1116	ซูโครส	ไม่มี	72 ชั่วโมง	4.20

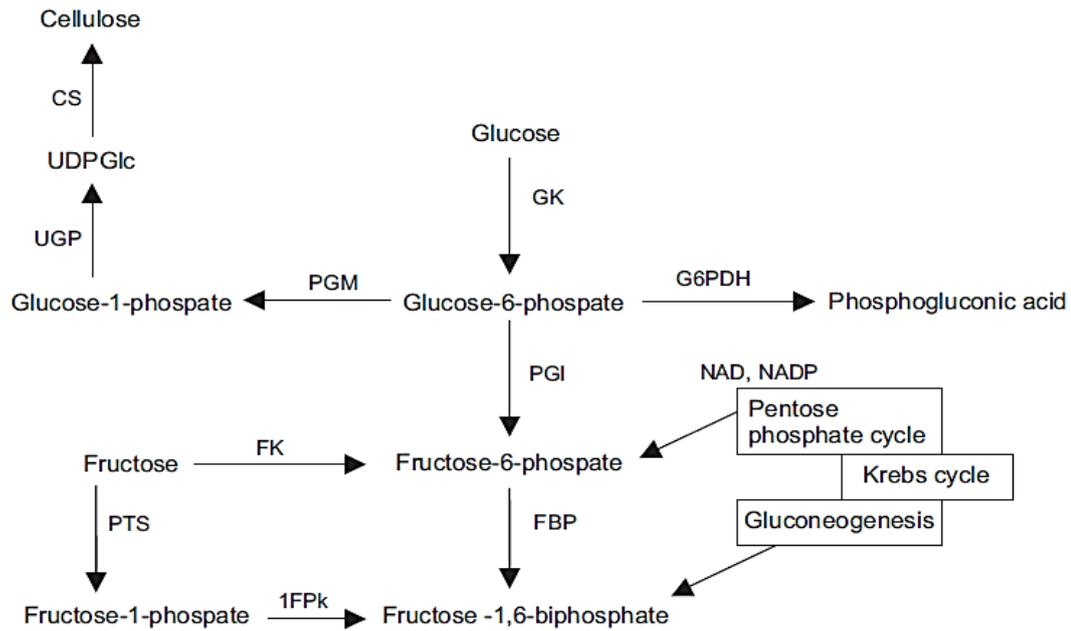
2.3 การสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส

การสังเคราะห์เซลลูโลสจากสารตั้งต้นมีกระบวนการผลิตที่ซับซ้อนหลายขั้นตอนที่มีความเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเอนไซม์และโปรตีนควบคุมจำนวนมาก แบคทีเรียลเซลลูโลสจัดเป็น Primary metabolic product กลไกการสังเคราะห์เซลลูโลสของ *A. xylinum* จะมีความคล้ายคลึงกับเซลลูโลสของพืชชั้นสูง ในระหว่างการสังเคราะห์แบคทีเรียต้องการออกซิเจนและแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชัน (Polymerization) มี UDP-Glucose (Uridine diphosphoglucose) เป็นสารตั้งต้น (precursor substance) (Ross และคณะ, 1991) ดังสมการ



กลไกการสังเคราะห์เซลลูโลสของ *A. xylinum* จัดเป็นกระบวนการเมทาบอลิซึมขั้นสุดท้ายของการใช้ประโยชน์จากคาร์บอน โดยเกี่ยวข้องกับ pentose phosphate cycle หรือ Krebs cycle ควบคู่ไปกับกระบวนการ gluconeogenesis แบคทีเรียดังกล่าวจัดเป็นแบคทีเรียกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) จึงไม่มีกระบวนการ glycolysis เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ phosphofructose kinase ได้ (Ross และคณะ, 1991)

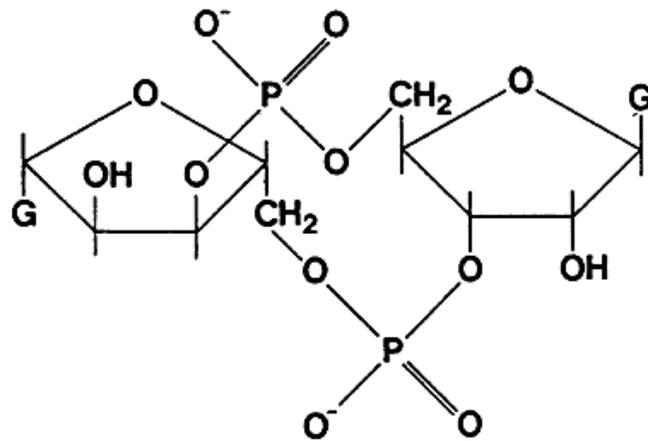
กลไกการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของโดยจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนสารประกอบซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ hexoses, glycerol, dihydroxy acetone, pyruvate และ dicarboxylic acids ไปเป็นเซลลูโลส โดยสารประกอบต่างๆ จะเข้าสู่ Krebs cycle ในช่วงของ oxaloacetate decarboxylation ไปเป็น pyruvate คือเปลี่ยน hexoses ในกระบวนการ gluconeogenesis เช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอนตัวอื่น สารตั้งต้นของการผลิตเซลลูโลสโดยตรงคือ UDPGlc ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เดิมของวิถีการผลิตนี้ ซึ่งจะมีในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งพืชด้วย และเกี่ยวข้องกับกระบวนการ glucose phosphorylation ซึ่งกลูโคสจะถูกเปลี่ยนไปเป็น glucose-6-phosphate (Glc-6-P) โดยเอนไซม์กลูโคไคเนส (glucokinase) จากนั้น glucose-6-phosphate ถูกไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) ด้วยเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (phosphoglucomutase) เปลี่ยนเป็น glucose-1-phosphate แลถูกเปลี่ยนไปเป็น Uridine 5'-diphosphoglucose (UDPGlc) โดยเอนไซม์ตัวสุดท้ายนี้คือ UDPGlc pyrophosphorylase ซึ่งส่วนสำคัญในการสังเคราะห์เซลลูโลส ในขั้นตอนสุดท้าย UDPGlc ถูกสังเคราะห์เป็นแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูโลสซินเทส (cellulose synthase) (Chawla และคณะ, 2009) แสดงดังภาพที่ 3 โดยมี cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) เป็นตัวกระตุ้น (activator) แสดงดังภาพที่ 4



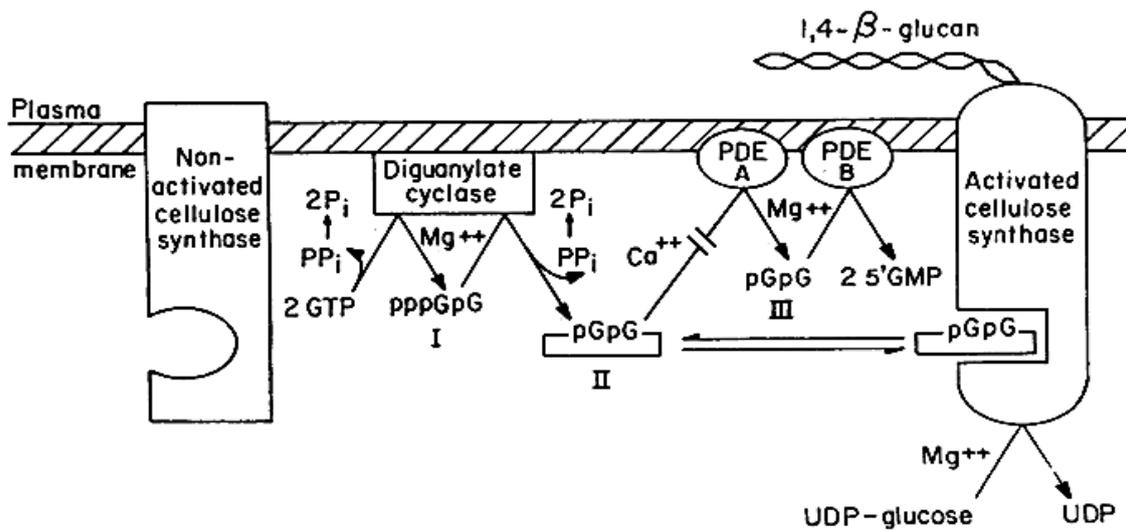
ภาพที่ 3 วิถีของกระบวนการเมทาบอลิซึมของ *A. xylinum* ในการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลส

CS คือ cellulose synthase, FBP คือ fructose-1, 6-biphosphate phosphatase, FK คือ glucokinase, G6PDH คือ glucose -6-phosphatedehydrogenase, 1PFk คือ fructose-1-phosphatekinase, PGI คือ phospho glucoisomerase, PMG คือ phosphoglucomutase, PTS คือ system of phosphotransferases, UGP คือ pyrophosphorylase UDPGlc, Fru-bi-P คือ fructose -1,6-biphosphate, Fru-6-P คือ fructose-6-phosphate, Glc-6(1)-P คือ glucose-6(1)-phosphate, PGA คือ phosphogluconic acid และ UDPGlc คือ uridine diphosphoglucose (Chawla และคณะ, 2009).

เอนไซม์เซลลูโลสซินเทส หรือ 1,4- β -D-glucan 4- β -D-glucosyltransferase ; EC 2.4.1:12 เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสโดยกระบวนการโพลีเมอไรเซชัน เอนไซม์เซลลูโลสซินเทสที่สังเคราะห์ขึ้นโดย *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) โดยมีเอนไซม์ Diguanilate cyclase เป็นตัวเร่ง หรือสังเคราะห์โดยการย่อยสลาย GTP โดยมีเอนไซม์ Phosphodiesterases A และ B เป็นตัวเร่ง ดังภาพที่ 5 (Ross และคณะ, 1991)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของ cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) (Ross และคณะ,1991)



ภาพที่ 5 โมเดลการควบคุมการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสของ *A. xylinum* (Ross และคณะ,1991)

2.4 การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดยกระบวนการหมัก

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลส

อาหาร สภาวะสิ่งแวดล้อม และผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by-product) ที่เกิดขึ้น ล้วนแล้วเป็นปัจจัยที่จะส่งผลกระทบต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส โดยทั่วไปอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนสูงและมีแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด จะสามารถผลิตโพลีแซคคาไรด์ได้สูงถึง 60-80 เปอร์เซ็นต์ ของแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ในกระบวนการหมัก เพราะฉะนั้น การศึกษาสภาวะของอาหารให้เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นปัจจัยสำคัญ เพื่อเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสที่สูงขึ้น สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อ ได้แก่ คาร์บอน, ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, ซัลเฟอร์, โพแทสเซียม และเกลือแมกนีเซียม (Chawla และคณะ, 2009) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ตลอดจนการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสมีดังต่อไปนี้

แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ (Stabury และ Whitaker, 1984) ซึ่งในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดยทั่วไปจะใช้กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต แต่ยังคงมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องเพื่อหาแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ เช่น ฟรุกโตส มอลโตส ไฮโลส แป้ง และกลีเซอรอล (Masaoka และคณะ 1993) จากการศึกษาของ Park และคณะ (2003) พบว่าแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตจาก *G. hansenii* PJK (KCTC 10505 BP) โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีผลได้ 1.72 กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาของ Son และคณะ (2003) พบว่าแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตจาก *Acetobacter* sp. V6 ที่แยกได้จากการหมักน้ำส้มสายชู โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีผลได้ 4.16 กรัมต่อลิตร จึงเห็นได้ว่าผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นมีความสำคัญต่อการแบคทีเรียเซลลูโลส และจากการศึกษาการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 6, 12, 24 และ 48 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการนำไปใช้เท่ากับ 100, 100, 68 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น ตามลำดับ (Masaoka และคณะ, 1993)

Ishihara และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจาก *A. xylinum* IFO 15606 โดยใช้ไฮโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีผลได้ 3.0 กรัมต่อลิตร Ramana และคณะ (2002) ได้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจาก *A. xylinum* NCIM 2526 พบว่าซูโครส กลูโคส และแมนนิทอล เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต ต่อมา Nguyen และคณะ (2008) ได้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจาก

Gluconacetobacter xylinus พบว่า แมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงที่สุด

Bae และ Shoda (2005) ได้ศึกษาการผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* BPR2001 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักแบบขวด (jar fermenter) พบว่ากากน้ำตาลที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและความร้อนสามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงถึง 76 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่ากากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และยังส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มสูงขึ้นเป็นสองเท่า นอกจากนี้ ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในช่วง 23-72 กรัมต่อลิตร ของกากน้ำตาลที่ผ่านการปรับสภาพ พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ในกากน้ำตาลส่งผลให้มีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพในการหมักแบบขวด

แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source)

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนและในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งในเซลล์ของแบคทีเรียมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันไป แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีสารไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) แต่บางสายพันธุ์ต้องการสารไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen) แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เป็นสารประเภทก๊าซแอมโมเนียม เกลือแอมโมเนียม และ ไนเตรท สำหรับแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อแอมโมเนียม ถูกใช้ไปจะทำให้ค่าพีเอชของอาหารเกิดสถานะเป็นกรดเนื่องจากเกิดการสะสมอนุมูลซัลเฟต ก๊าซแอมโมเนียมและไนเตรทเมื่อถูกเมตาโบไลต์และทำให้เกิดสถานะที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Stabury และ Whitaker, 1984) Ramana และคณะ (2002) รายงานว่าการผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลสจาก *A. xylinum* โดยใช้เคซีนไฮโดรไลเซตและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลได้เท่ากับ 5 และ 4.8 g/ L ตามลำดับ

ค่าพีเอช (pH)

ค่าพีเอชของอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์และการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมัก (Ohara และคณะ, 1992) และยังผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารอาหาร (Andreyera และ Biryukov, 1973) รวมถึงการยอมให้สารอาหารผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ได้ Masaoka และคณะ (1993) รายงานว่าค่าพีเอชของอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสอยู่ในช่วง 4.0-6.0 แต่หากค่าพีเอชของอาหารลดลงต่ำกว่า 4 จะส่งผลให้การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสลดลงโดยในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าจุลินทรีย์มีการผลิตกรดกลูโคนิก กรดอะซิติก และกรดแลคติก ส่งผลให้พีเอชของน้ำหมักลดลง (Kongruang, 2008)

Alaban (1962) รายงานว่าค่าพีเอชของอาหารในการเพาะเลี้ยง *A. xylinus* ที่พีเอช 4.0-5.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส ที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 3.0 การเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลง และที่ค่าพีเอชมากกว่า 8.0 เชื้อจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ส่วนการเติม กรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1-10 เปอร์เซ็นต์ นอกจากเป็นการปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ได้ เมื่อเติมกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มปริมาณกรดเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อ *Penicillium* sp. และ *Bacillus* sp. ได้ (จุฬารัตน์ เลิศบรรจงศ์, 2533)

Kongruang (2008) รายงานว่าการหมักในสภาวะนิ่ง (Static fermentation) โดยใช้ *G. xylinus* จะทำให้พีเอชของอาหารลดลง เนื่องมาจากกระบวนการหายใจของเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการออกซิเดชันเอทานอลไปเป็นกรดอะซิติก และการเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิก ส่วนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-Batch Fermentation) Shezad และคณะ (2010) และ Jagannath และคณะ (2008) รายงานว่าค่า พีเอชของอาหารคงที่เนื่องมีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะๆ

อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อทั้งการเจริญของแบคทีเรียและการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส จากการศึกษาพบว่า อุณหภูมิในช่วง 28-30 °C สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงสุด (Gromet-Elhanan และคณะ, 1963; Hestrin และ Schramm, 1954) Alaban (1962) รายงานว่าในกระบวนการหมัก *Acetobacter* sp. ในอาหารน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิในช่วง 10-45 °C พบว่าที่อุณหภูมิ 45 °C เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ แต่จะไม่ผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส ซึ่งการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสจะเริ่มมีการผลิตตั้งแต่อุณหภูมิ 20 °C จนถึงช่วงอุณหภูมิ 28-32 °C ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตเซลลูโลสในปริมาณสูง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะเกิดผลเสียต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ การเสถียรภาพของโปรตีน โครงสร้างของแฟลกเจลลา ไโรโบซอม โปรโตพลาส และไมโทคอนเดรีย (Kovac และ Subik, 1970)

ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen)

โดยทั่วไปการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสจุลินทรีย์จำเป็นต้องมีการใช้ออกซิเจนเป็นอย่างมาก เพราะฉะนั้นปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ และอาจส่งผลต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส (Shirai และคณะ, 1994) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารที่แตกต่างกันอาจมีผลมาจากการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วในการกวน (Tantratian และคณะ, 2005) Hwang และคณะ (1999) รายงานว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงเกินไปจะส่งผลให้จุลินทรีย์ใช้กลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดกลูโคนิก ทำให้การผลิต

แบคทีเรียลเชลลูโลสลดลง และหากมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำเกินไปจะส่งผลให้การเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสลดลง

Kouda และคณะ (1997) ได้ศึกษาผลของออกซิเจนและความดันของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในการผลิตของแบคทีเรียลเชลลูโลสโดย *Acetobacter* ในสภาวะอาหารที่มีการให้ออกซิเจนและมีการกวนพบว่า อัตราการผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสขึ้นอยู่กับอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูงขึ้นจะทำให้อัตราการส่งผ่านของออกซิเจนลดลง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าความดันของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ส่งผลให้การผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสลดลง ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในระบบให้มากขึ้น

เชื้อ *Acetobacter* sp. ผลิตมีเอนไซม์อะไพเรส (apirase) ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลายพลังงาน ATP ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานและมีการสะสมในระหว่างปฏิกิริยา ออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เหลือพลังงาน ATP สำหรับกิจกรรมของเมตาโบลิซึมอื่นๆ ของเซลล์ในระดับต่ำ ดังนั้น เมื่องดการให้อากาศทำให้พลังงาน ATP ในแหล่งเก็บพลังงานหรือ ATP pool สูญเสียไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

Chao และคณะ (2001) ได้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและมีความเข้มข้นของฟรุกโตสแตกต่างกัน ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศลอยตัวที่ไหลเวียนภายใน (internal-loop airlift reactor) ขนาด 50 ลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นของฟรุกโตสเริ่มต้นในช่วง 60-70 กรัมต่อลิตร ให้อัตราการผลิตและความเข้มข้นของแบคทีเรียลเชลลูโลสสูงสุดคือ 0.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 10.4 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสพร้อมทั้งแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมไปด้วย โดยการนำทิ้งประเภทแป้ง (starchy wastewater) มาใช้ในการผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลส ซึ่งได้มาจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น โรงงานผลิตแป้งสำหรับประกอบอาหาร โรงงานขนมจีน เป็นต้น รวมทั้งน้ำซาวข้าว (water from washing rice) ซึ่งเป็นน้ำที่ได้จากการซาวข้าว ซึ่งหากปล่อยลงสู่แม่น้ำจะทำให้แม่น้ำเสียและยังเป็นการลดต้นทุนการผลิต อีกทั้งยังได้ใช้ความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยในกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้แบคทีเรียลเชลลูโลสที่สามารถนำไปประยุกต์ในงานด้านต่างๆ ได้ และสุดท้ายยังสามารถช่วยลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่งด้วย โดยเริ่มต้นตั้งแต่การคัดแยกเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง รวมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลสจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของน้ำตาล สัดส่วนของกลีเซอรอล และเวลาที่ใช้ในการผลิต เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการ

3.1 การเตรียมน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง

นำน้ำทิ้งประเภทแป้ง โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาน้ำซาวข้าว เป็นตัวอย่างเบื้องต้นของน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแป้ง เริ่มต้นจากการนำน้ำซาวข้าวที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อขจัดตะกอนต่างๆ และนำส่วนใสที่ได้ไปผ่านการกรองโดยใช้กระดาษกรอง จากนั้นเก็บส่วนใสของน้ำซาวข้าวที่ได้นำไปใช้ในการเตรียมอาหาร (starchy wastewater medium) นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อและปรับความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร

3.2 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างผลไม้ต่างๆ โดยตัดชิ้นตัวอย่างน้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดแก้วขนาด 16×150 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ HS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน คัดเลือกเฉพาะตัวอย่างหลอดแก้วที่มีแผ่นฟิล์มเซลล์ลูลอยอยู่บนผิวของอาหารไปทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ streak เชื้อที่คัดเลือกในงานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง HS และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สังเกตลักษณะโคโลนีที่มีสีขาวนวล (milk-white) มีความนูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร (Convex) และผิวหน้าของโคโลนีเรียบ (Smooth) จากนั้นนำโคโลนีที่ได้มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้ง และเก็บตัวอย่างเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3 การเตรียมกล้าเชื้อในการทดลอง

ดูดเชื้อที่เก็บไว้ในข้อ 3.2 ใส่ลงในหลอดแก้วขนาด 16×150 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ HS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ HS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ซึ่งจะเห็นแผ่นฟิล์มเซลล์ลูลอยอยู่บนผิวของอาหาร จากนั้นนำมาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องโฮโมจีไนซ์ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที และนำไปกรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อใช้เป็นค่าความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นในการทดลอง

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส

3.4.1 การศึกษาชนิดของอาหารต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสำหรับการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสสูงสุด ถ้ายกกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ HS และ YE ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พีเอชเท่ากับ 5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะการหมักแบบนิ่ง (static conditions) และเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หน้าหนักของแบคทีเรียเซลลูโลสแห้ง

3.4.2 การศึกษาระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสของเชื้อในอาหาร starchy wastewater

ถ้ายกกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ลงอาหารที่เชื้อสามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงจากการศึกษาในข้อ 3.4.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งจะใช้น้ำข้าวข้าวแ่งเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการเติมน้ำตาลกลูโคส โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหาร starchy wastewater เท่ากับ 5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการหมักแบบนิ่ง (static culture) ซึ่งเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หน้าหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลส จนกระทั่งหน้าหนักแห้งของการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสคงที่

3.4.3 การศึกษาพีเอชต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสของเชื้อในอาหาร starchy wastewater

ถ้ายกกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ลงอาหารที่เชื้อสามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงจากการศึกษาในข้อ 3.4.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งจะใช้น้ำข้าวข้าวแ่งเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการเติมน้ำตาลกลูโคส โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหาร starchy wastewater เท่ากับในช่วง 3.0 ถึง 6.0 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการหมักแบบนิ่ง (static culture) วิเคราะห์หน้าหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลส

3.4.4 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ของกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสของเชื้อในอาหาร starchy wastewater

ถ้ายกกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร ลงอาหารที่เชื้อสามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงจากการศึกษาในข้อ 3.4.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งจะใช้น้ำทิ้งประเภทแ่งเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการเติมน้ำตาลกลูโคส โดยมีความ

เข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของอาหาร starchy wastewater เท่ากับพีเอชที่สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงที่สุดจากการศึกษาในข้อ 3.4.3 และใส่กล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 2 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการหมักแบบนิ่ง (static culture) วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลส

3.5 วิธีวิเคราะห์

3.5.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียเซลลูโลส

วิธีวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียเซลลูโลสวัดในรูปน้ำหนักแห้งหลังจากสกัดแบคทีเรียเซลลูโลส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล ตัดแปลงมาจากวิธีการของ Joseph และ คณะ (2003)

3.5.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-sulfuric ของ Dobois และคณะ (1956)

บทที่ 4

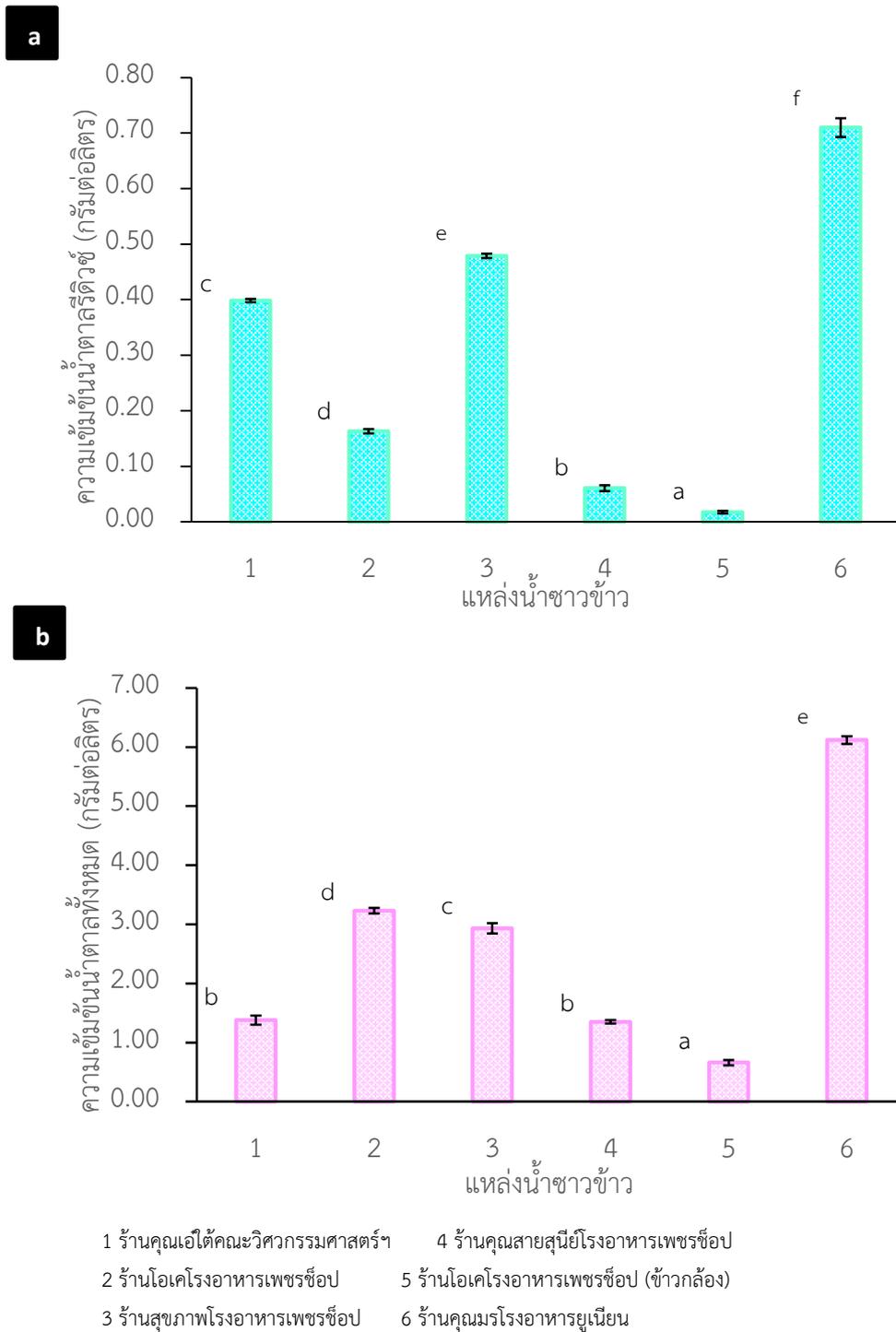
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาตัวอย่างน้ำข้าวข้าว

สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำข้าวข้าวในการศึกษาเพื่อผลิตแบคทีเรียแลคโตส เก็บจากร้านจำหน่ายอาหาร จำนวน 6 ตัวอย่าง ภายในมหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม ดังแสดงในตารางที่ 3 จากนั้นนำน้ำข้าวข้าวที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดเศษข้าวและตะกอนต่าง ๆ นำส่วนใสที่ได้มาผ่านการกรองโดยใช้กระดาษกรองขนาดของรูพรุน 11 ไมโครเมตร อีกครั้งเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่อาจไม่ตกตะกอน เก็บส่วนใสของน้ำข้าวข้าวที่ผ่านการกรองมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS พบว่าตัวอย่างน้ำข้าวข้าวที่ 6 คือ ร้านคุณมรจากโรงอาหารยูเนี่ยน มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 0.71 กรัมต่อลิตร และตัวอย่างน้ำข้าวข้าวที่ 1 ถึง 5 มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 0.40, 0.16, 0.48, 0.06 และ 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 6a เมื่อพิจารณาวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric พบว่าตัวอย่างน้ำข้าวข้าวที่ 6 คือ ร้านคุณมรจากโรงอาหารยูเนี่ยน ซึ่งเป็นข้าวหอมมะลิ ตรา 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 ดังนั้น จึงเลือกน้ำข้าวข้าวร้านคุณมรจากโรงอาหารยูเนี่ยนเพื่อใช้สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำข้าวข้าว (water from washing rice medium; WWR) เป็นแหล่งคาร์บอน และปรับลดความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดให้ต่ำกว่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดจริงที่วัดได้ เพื่อช่วยลดปัญหาความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในน้ำข้าวข้าวที่ไม่แน่นอน เมื่อนำมาทดลองในครั้งต่อไป โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร ทุกการทดลอง จากการศึกษาการผลิตแบคทีเรียแลคโตสของ Masaoka *et al.* (1993) พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 6, 12, 24 และ 48 กรัมต่อลิตร มีการนำกลูโคสไปใช้เท่ากับ 100, 100, 68 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น ตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่สูงเกินไป แบคทีเรียมีการนำไปใช้ได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคสที่ต่ำ และหากความเข้มข้นของกลูโคสสูงเกินไปส่งผลต่อความสิ้นเปลืองกลูโคสที่เติมลงไปโดยปราศจากประโยชน์

ตารางที่ 3 แหล่งที่มาของน้ำข้าวข้าว

ตัวอย่างที่	แหล่งที่มาของน้ำข้าวข้าว	แหล่งที่มาของข้าว
1	ร้านคุณเอ้ได้คุณะวิศกรกรมศาลาตรา	ข้าวเจ้าเก่าปี ตราเรือใบ ผลิตโดยโรงสีพันทวี อำเภอตำบลนครราชสีมา
2	ร้านโอเคโรงอาหารเพชรช้อป	ข้าวหอมมะลิ ตราส้มโอ ผลิตโดยโรงสีเจริญผล อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา
3	ร้านสุขภาพโรงอาหารเพชรช้อป	ข้าวหอมมะลิ ตราช้างไทย ผลิตโดยโรงสีไทยเกษตร อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์
4	ร้านคุณสายสุณีโรงอาหารเพชรช้อป	ข้าวเหลืองอ่อน ตราทองหนึ่ง ผลิตโดยโรงสีเจริญเกษตร อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม
5	ร้านโอเคโรงอาหารเพชรช้อป (ข้าวกล้อง)	ข้าวหนึ่ง (parboiled rice) ตรา Oriba rice บางรัก กรุงเทพมหานคร
6	ร้านคุณมรโรงอาหารยูเนียน	ข้าวหอมมะลิ ตรา ๙ ตี ผลิตโดยโรงสีทรัพย์ อำเภอคำเขื่อนแก้ว จังหวัดยโสธร



ภาพที่ 1 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) (a) และความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) (b) ของน้ำชาข้าวจากแหล่งที่มาต่าง ๆ รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

4.2 การคัดแยกเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส

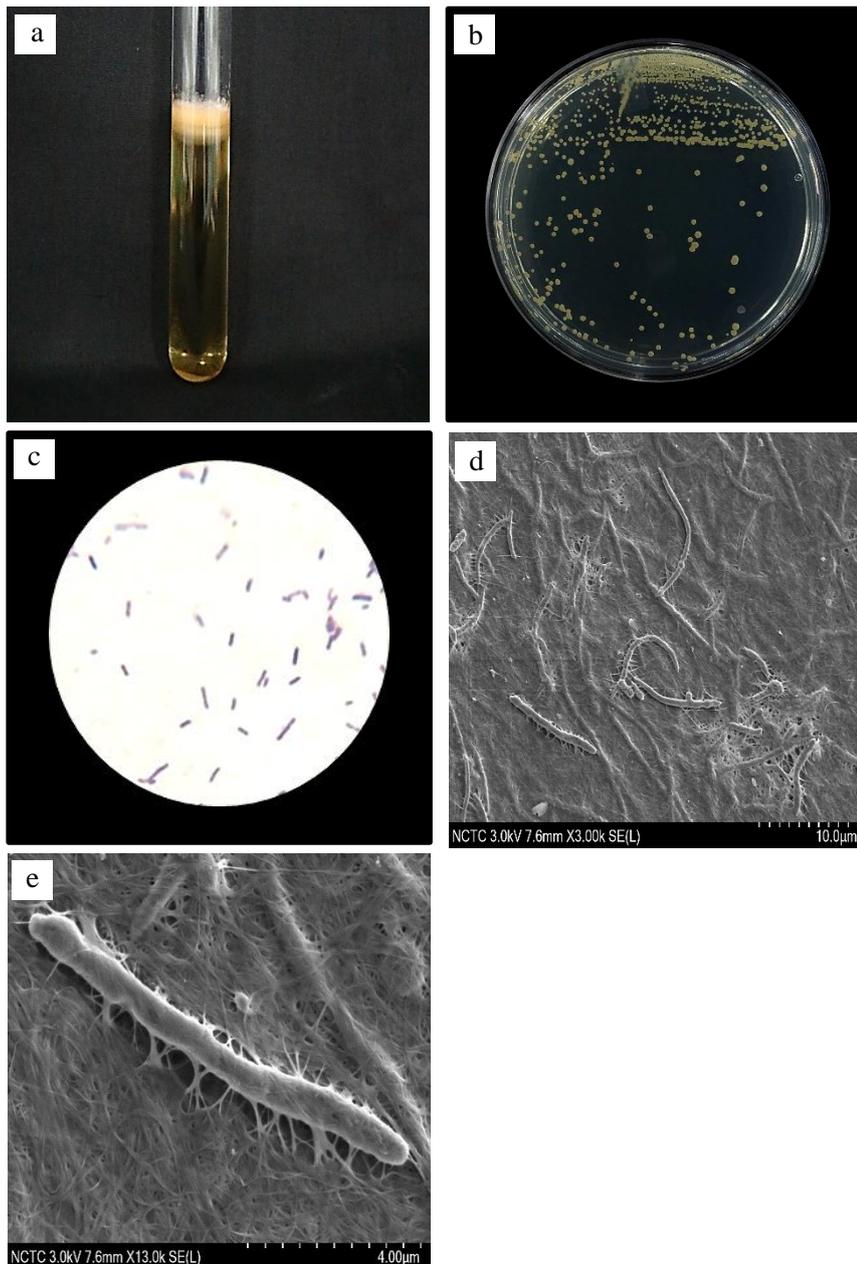
ตัวอย่างผลไม้ที่นำมาคัดแยกเชื้อจำนวน 38 ตัวอย่าง เก็บมาจากตลาดต่าง ๆ ภายในอำเภอเมือง จังหวัด นครปฐม ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยคัดเลือกผลไม้ที่สุกงอม และตัดชิ้นตัวอย่างผลไม้น้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ลงใน หลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง HS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture) ผลการทดลองพบว่า ปรากฏแผ่นเซลลูโลสลอยอยู่บนผิวของอาหารเพาะเลี้ยงเพียงตัวอย่างเดียว คือตัวอย่างที่ 38 ซึ่งคัดแยกจาก แอปเปิ้ล แสดงดังภาพที่ 7a และเมื่อนำไปเขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) ที่ความเร็วสูง ยังคง ปรากฏแผ่นเซลลูโลส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tanskul และคณะ (2013) ที่รายงานว่า แผ่นเซลลูโลสที่ ลอยอยู่บนผิวของอาหารเหลวผลิตได้จากจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ยังคงปรากฏแผ่นเซลลูโลส เมื่อนำไปเขย่า หรือ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส โดยนำหลอดตัวอย่างที่ 38 มา streak ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร HS และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน พบว่า มี ทั้งหมด 12 ไอโซเลท และนำแต่ละไอโซเลทที่มีลักษณะสีขาวนม (milk-white) มีความหนูนโด้งจากผิวหน้า อาหาร (Convex) และผิวหน้าของโคโลนีเรียบ (Smooth) มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร SH และนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่า มีเพียงไอโซเลทเดียวที่สามารถผลิตแผ่นเซลลูโลสที่ลอย อยู่บนผิวของอาหารเพาะเลี้ยงคือ สายพันธุ์ Li1 ซึ่งมีลักษณะโคโลนีที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ แสดงดังภาพที่ 7b จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) พบว่า ลักษณะของเชื้อสายพันธุ์ Li1 มีรูปร่างเป็นแท่ง ขนาด ประมาณ 0.4×5.4 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 7d และ 7e

ตารางที่ 4 ชนิดผลไม้และแหล่งที่มาของผลไม้ที่นำมาคัดแยกเชื้อผลิตแบคทีเรียลเชลลูโลส

ตัวอย่างที่	ชนิดผลไม้	แหล่งที่มา
1	กล้วยน้ำว้า (<i>Musa</i> ABB cv. Kluai 'Namwa')	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>)	ตลาดปทุมมงคล
27	ลูกพลับ (<i>Diospyros kaki</i>)	ตลาดล่างองค์พระปฐมเจดีย์
28	ลูกแพร์ (<i>Pyrus communis</i>)	ตลาดกลางผักและผลไม้
29	ลูกไหนด (<i>Prunus domestica</i>)	ตลาดกลางผักและผลไม้
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>)	ตลาดกลางผักและผลไม้
34	สับปะรด (<i>Ananas comosus</i>)	ตลาดบนองค์พระปฐมเจดีย์
35	สาลี (<i>Pyrus pyriflora</i>)	ตลาดกลางผักและผลไม้
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), โคลนีสบริสุทธิ์ที่ผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส (b), ลักษณะสัญญาณของเชื้อหลังการย้อมแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (c) และ ลักษณะสัญญาณของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า (d) และ 20,000 เท่า (e)

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

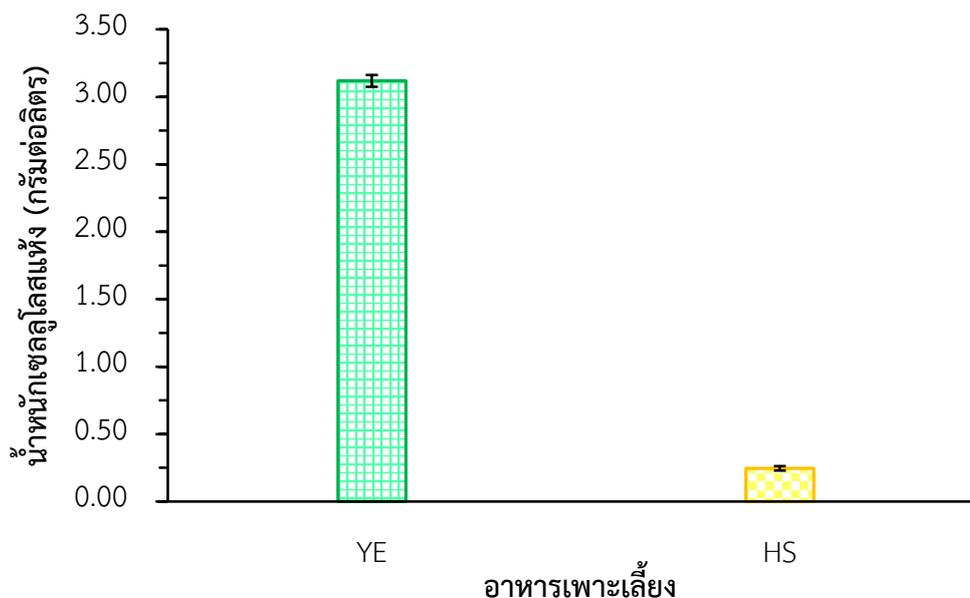
4.3 การจัดจำแนกจุลินทรีย์โดย 16s rDNA

การจัดจำแนกจุลินทรีย์วิเคราะห์ ณ. ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) จำแนกโดยการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ของยีน 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 สามารถออกซิไดซ์แอสซิเตต และแลคเตตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ผลิตรกรดแอซิติคจากเอทานอลได้ เจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยง AG (955. AG MEDIUM) ที่มีความเข้มข้นของกรดแอซิติกร้อยละ 0.35 แต่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยง AE (849. AE MEDIUM) ที่มีความเข้มข้นของกรดแอซิติคสูงร้อยละ 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 พีเอชเท่ากับ 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 และคณะ, 2016) ดังนั้น จึงเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยง YE มาศึกษาการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดยใช้น้ำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน แทนการเติมน้ำตาลกลูโคส โดยใช้น้ำข้าวข้าวที่ไม่ผ่านกระบวนการปรับสภาพเพื่อเป็นการลดต้นทุนในกระบวนการผลิต ทั้งในด้านสารเคมีและพลังงาน อีกทั้งยังประหยัดเวลาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย



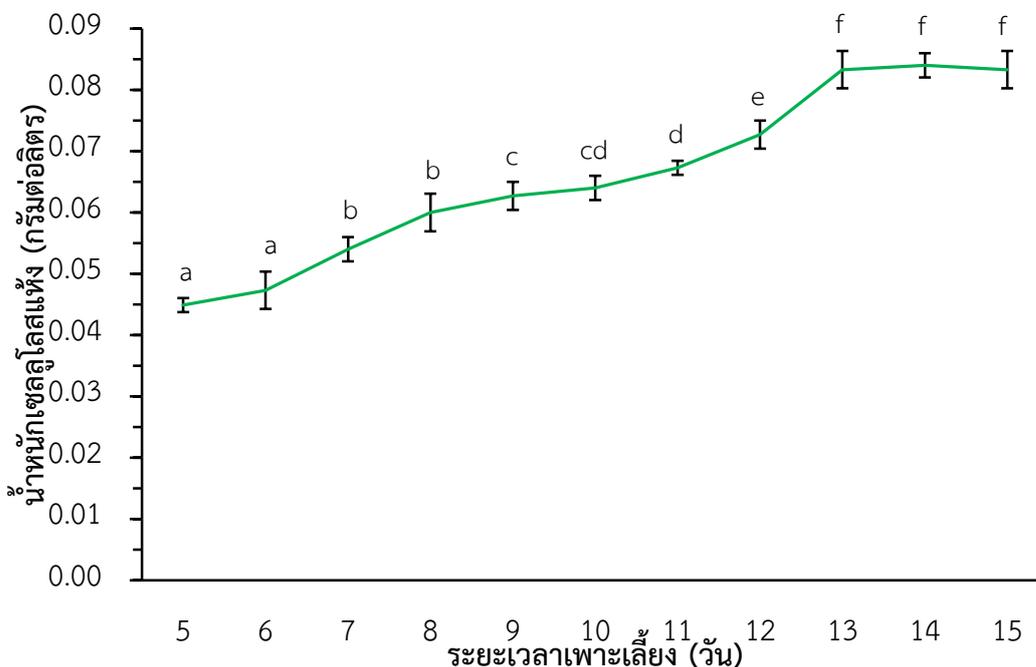
ภาพที่ 8 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดย *K. Nataicola* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

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 ของการเพาะเลี้ยงได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสในวันที่ 13, 14 และ 15 เท่ากับ 0.083 ± 0.0031 , 0.084 ± 0.0020 และ 0.083 ± 0.0031 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 9 จากการศึกษาเชื้อในสกุลเดียวกัน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Sheykhnazari *et al.* (2011) ที่รายงานว่า *Gluconacetobacter xylinus* มีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสเพิ่มขึ้นตามเวลาของการเพาะเลี้ยง และไม่มีการผลิตเพิ่มมากขึ้น หลังจากวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง Pedro Carreira *et al.* (2011) พบว่า *Gluconacetobacter swingsii* สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงสุดในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง โดยใช้แมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน และ Hungund (2013) พบว่า *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงสุดในวันที่ 14 ของการ

เพาะเลี้ยง โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้น จึงเลือกระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 13 วัน ใช้ในการศึกษาต่อไป

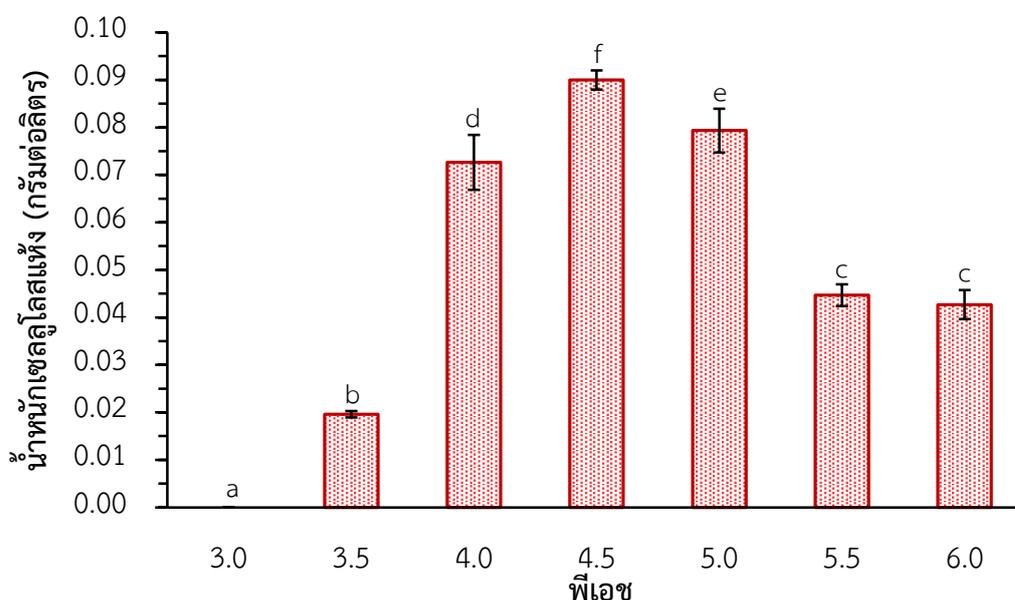


ภาพที่ 9 ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดย *K. Nataicola* ในอาหาร WWR ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p <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

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* สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงที่พีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสเท่ากับ 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* ไม่มีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส แสดงดังภาพที่ 10 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Hwang *et al.* (1999) ที่รายงานว่า พีเอชของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสคือ 4.5 และไม่มีการแบคทีเรียเซลลูโลสเมื่อพีเอชต่ำกว่า 3.5 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Masaoka *et al.* (1993) ที่รายงานว่า ค่าพีเอชของอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสอยู่ในช่วง 4.0-6.0 แต่หากค่าพีเอชของ

อาหารลดต่ำกว่า 4 ส่งผลให้การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสลดลง เนื่องจากค่าพีเอชส่งผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ และการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมัก (Ohara *et al.*, 1992) และยังผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารอาหาร (Andreyeva and Biryukov, 1973) รวมถึงการยอมให้สารอาหารผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ได้ นอกจากนี้ Masaoka *et al.* (1993) พบว่า ในระหว่างกระบวนการหมักแบบนิ่ง ส่งผลให้พีเอชของอาหารลดลง เนื่องจากเมแทบอลิซึมการหายใจของ *Gluconacetobacter xylinus* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการออกซิเดชันเอทานอลไปเป็นกรดแอซิติก (acetic acid) และการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิก (gluconic acid) เพราะฉะนั้น การควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเซลล์และการผลิตเซลลูโลสจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง (Kongruang, 2008) ดังนั้น จึงเลือกพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4.5 ใช้ในการศึกษาต่อไป

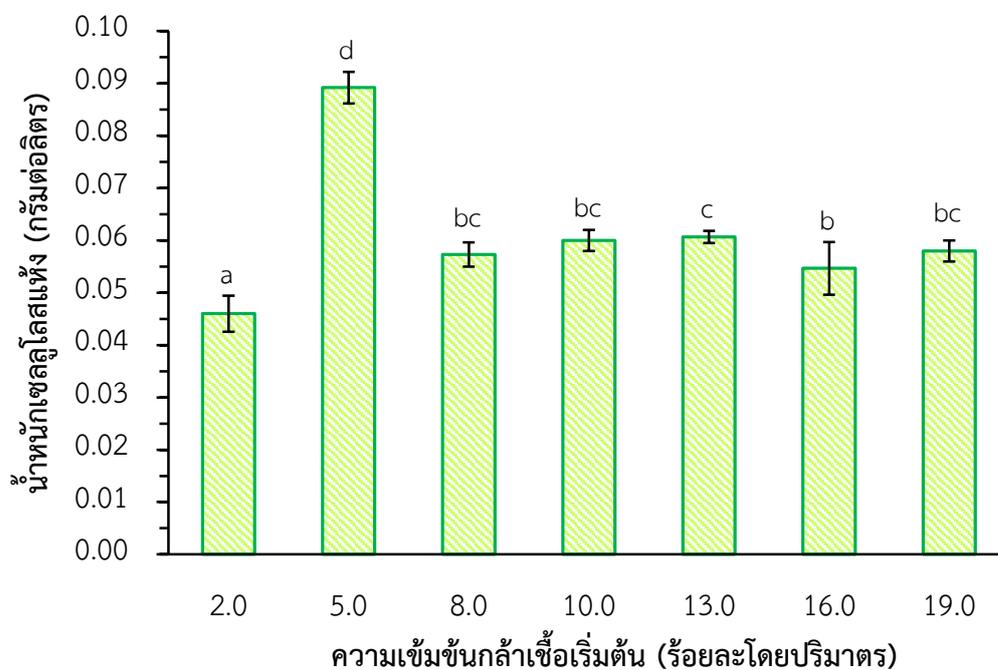


ภาพที่ 10 พีเอชต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดย *K. Nataicola* ในอาหาร WWR ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p <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

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 จากนั้นนำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง พบว่า *K. Nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงสุด ที่ความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียเซลลูโลสเท่ากับ 0.089 ± 0.0030 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน แสดงดังภาพที่ 11 เมื่อเพิ่มความเข้มข้น

กล้าเชื้อเริ่มต้นเป็น 8.0, 10.0, 13.0 และ 19.0 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร พบว่า มีการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส น้อยกว่าที่ความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร แสดงดังภาพที่ 11 เนื่องจากความเข้มข้นกล้าเชื้อเริ่มต้นมากส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียมีมากเกินไป ซึ่งภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารอยู่อย่างจำกัด ทำให้เกิดภาวะการแข่งขัน โดยในภาวะนี้แบคทีเรียไม่มีการสร้างสารทุกชนิด จึงมีการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส ลดลง (Alaban, 1962) เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์กล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 2.0 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร พบว่า *K. Nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้ต่ำ ได้น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียลเซลลูโลสเท่ากับ 0.046 ± 0.0035 กรัมต่อลิตรต่อ 13 วัน แสดงดังภาพที่ 11 ดังนี้



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

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากแนวคิดในการนำสิ่งเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้น้ำตาล เพื่อผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส อีกทั้งยังช่วยลดต้นทุนในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส และช่วยลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้คัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากผลไม้พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ Li1 ซึ่งคัดแยกได้จากแอปเปิ้ล (*Malus pumila*) ถูกจำแนกเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) nataicola* สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง YE ได้มากกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง SH ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่งสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง WWR ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร คือ ความเข้มข้นของกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร พีเอช 4.5 และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 13 วัน

เอกสารอ้างอิง

- จุฬารกรณ์ เลิศบรรจงศ์. 2533. การผลิตและการใช้ประโยชน์เซลล์ูโลสจากแบคทีเรียเป็นสารให้ความคงตัว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมคิด ธรรมรัตน์ (2530). วุ้นจากน้ำมะพร้าว. กสิกร, 5: 433-435
- 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.
- 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, 4: 61-76.
- Bae, S. and Shoda, M. (2005) Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production using Box-Behnken design. Biotechnology and Bioengineering, 90: 20-28.
- Bodin, A., Bäckdahl, H., Petersen, N. and Gatenholm, P. (2011). Bacterial cellulose as biomaterial. In: Ducheyne, P. (Ed.), Comprehensive Biomaterials. Elsevier, Oxford, pp. 405-410.
- Brown, R. M. (2004). Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century? Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 42(3): 487-495.
- Brown, R. M. J. (1987). The biosynthesis of cellulose, Food Hydrocolloids, 1: 345-351.
- Chao, Y., Sugano, Y. and Shoda, M. (2001). Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor. Applied Microbiology and Biotechnology, 55(6): 673-679.
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A. and Singhal, R. S. (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. Food Technology Biotechnology, 47(2): 107-124.
- Couso, O. R., Ielpi, Garcia, C. R. and Dankert, A. M. (1981). Biosynthesis of Polysaccharides in *Acetobacter xylinum*. Journal of Biochemistry, 123: 617-627.
- Credoua, J. and Berthelot, T. (2014). Cellulose: from biocompatible to bioactive material. Journal of Materials Chemistry B, 2: 4767-4788.
- Deinema, M. H. and Zevenhuizen, L.P. (1971). Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation. Archives of Microbiology, 78(1): 42-51.

- Geyer, U., Heinze, T., Stein, A., Klemm, D., Marsch, S., Schumann, D and Schmauder, H. P. (1994b). Formation, derivatization and applications of bacterial cellulose, *International Journal of Biological Macromolecules*, 16 343–347.
- Geyer, U., Klemm, D. and Schmauder, H. P. (1994a). Kinetics of the utilization of different C sources and the cellulose formation by *Acetobacter xylinum*. *Biotechnologia Acta*, 14: 61–266.
- 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. P., Alabastro, E. F. and Tinsay, C. B. (1982). A submerged process for the production of nata. *NRCP. Research Bull*, 37(1): 1-50.
- Hestrin, S. and Schramm, (1954). M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58: 345–352.
- 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: 183–188.
- Huang, H. C., Chen, L. C., Lin, S. B., Hsu, C. P. and Chen, H. H. (2010). In situ modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation. *Bioresource Technology*, 101(15): 6084–6091.
- Iannino, N. I. D., Couso, O. R. and Dankert, A. M. (1988). Lipid-linked Intermediates and the Synthesis of Acetan in *Acetobacter xylinum*. *Journal of General Microbiology*, 134: 1731-1736.
- Isizawa, S. M. (1976). Araragi: Chromogenicity of Actinomycetes. In: *Actinomycetes: The Boundary Microorganisms*, T. Arai (Ed.), Toppan Co., Tokyo, Japan, 43–65.
- Ishihara, M., Matsunaga, M., Hayashi, N. and Tiler, V. (2002). Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 986–991.
- 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 (Natade-coco) by *Acetobacter xylinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11): 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(10): 2733–2744.
- Johnson, D. C. and Neogi, A. N. (1989). Sheeted products formed from reticulated microbial cellulose. Us Patent US4863565, 1989/09/05.
- Joseph, G., Rowe, G., Margaritis, A., and Wan, W. K. (2003). Effects of polyacrylamide-coacrylic acid on cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(9): 964–970
- Jonas, R. and Farah, L.F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polym*, 59: 101–106.
- Jung, J. Y., Park, J. and Chang, K. H. N. (2005). Bacterial cellulose production by *Gluconoacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 347–354.
- Keshk, S. and Sameshima, K. (2006a). Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 4–8.
- Keshk, S. and Sameshima, K. (2006b). The utilization of sugar cane molasses with/without the presence of lignosulfonate for the production of bacterial cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72: 291–296.
- Kim, J. Y., Kim, J. N., Wee, Y. J., Park, D. H. and Ryu, H. W. (2007). Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 in a rotary biofilm contactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137: 529–537.
- Kongruang, S. (2008). Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 148: 245–256.
- Kovac, L., and Subik, J. (1970). Some aspects of the preparation of yeast protoplasts and isolation of mitochondria. *Ada Fac. Med. Univ. Brun*, 37: 91-94.
- Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H. and Yoshinaga, F. (1997). Effects of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84: 124–127.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jezierska, A., Gonçalves-Mioekiewicz, M., Turkiewicz, M. and Bielecki, S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29: 189–195.
- Kuga, S. and Brown R. M. J. (1988). Silver labeling of the reducing ends of bacterial cellulose. *Carbohydrate Research*, 180: 345–350.

- Masaoka, S., Ohe, T. and Sakota, N. (1993). Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75: 18–22.
- Morgan, J. L., Strumillo, J. and Zimmer, J. (2013). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, 493(7431): 181–186.
- Nguyen, V. T., Gidley, M. J. and Dykes, G. A. (2008). Potential of a nisincontaining bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *Food Microbiology*, 25(3): 471–478.
- Nguyen, V. Y., Flanagan, B., Gidley, M. J. and Dykes, G. A. (2008). Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from kombucha. *Current Microbiology*, 57: 449–453.
- Occurrence, P. A. (1991). Richmond: and Functions of Native Cellulose. In: *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*, C.H. Haigler, P.J. Weimer (Eds.), Marcel Dekker, Inc. New York, USA, 5–23.
- 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.
- Ohara, H., Hiyama, K. and Yoshida, T. (1992). Kinetic study on pH dependence of growth and death of *Streptococcus faecalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 8 (3): 403-407.
- Park, J. K., Jung, J. Y. and Park, Y. H. (2003). Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnology Letters*, 25: 2055–2059.
- 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: 245–248.
- Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. (1991). Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. *Microbiological Reviews*, 55(1): 35-58.
- Seto, A., Saito, Y., Matsushige, M., Kobayashi, H., Sasaki, Y., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Ueda, K. and Beppu, T. (2006). Effective cellulose production by a coculture of *Gluconacetobacter xylinus* and *Lactobacillus mali*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73: 915–921.
- 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.

- Shirai, A., Takahashi, M., Kaneko, H., Nishimura, S., Ogawa, M., Nishi, N. and Tokura, S. (1994). Biosynthesis of a novel polysaccharide by *Acetobacter xylinum*, International Journal of Biological Macromolecules, 16: 297–300.
- Son, H. J., Kim, H. G., Kim, K. K., Kim, H. S. Kim, Y. G. and Lee, S. J. (2003). Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. Bioresource Technology, 86: 215–219.
- Stanbury, F. P. and Whitaker, A. (1984). Principles of fermentation technology. Oxford, Pergamon Press, 459 p.
- Sulaeva, I., Henniges, U. S., Rosenau, T. and Potthast, A. (2015). Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review. Biotechnology Advances, 33: 1547–1571.
- Tantratian, S., Tammarate, P., Krusong, W., Bhattarakosol, P. and Phunsri, (2005). A. Effect of dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter* sp. The Journal of Scientific Research Chulalongkorn University, 30: 179–186.
- Tonouchia, N., Taharaa, N., Tsuchidaa, T., Yoshinagaa, F., Beppuab, T. and Horinouchiab, S. (1995). Addition of a Small Amount of an Endoglucanase Enhances Cellulose Production by *Acetobacter xylinum*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 59(5): 805-808.
- 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 feature and properties of bacterial cellulose produced in agitated. Cellulose, 5: 187-200.
- Wiegand, C. and Klemm, D. (2006). Influence of protective agents for preservation of *Gluconacetobacter xylinus* on its cellulose production, Cellulose, 13 485–492.
- Yoshino, T., Asakura, T. and K. Toda, (1996). Cellulose production by *Acetobacter pasteurianus* on silicone membrane, Journal of Fermentation and Bioengineering 81: 32–36.

ภาคผนวก

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

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 ด้วยกรดซिटริกความเข้มข้น 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

นำส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นผงวุ้น (Agar powder) มาละลายในน้ำกลั่น และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 ด้วยกรดซिटริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร เติมผงวุ้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเทลงจานเพาะเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ 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 ด้วยกรดซิตริกความเข้มข้น 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 ด้วยกรดซิตริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร เติมผงวุ้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเทลงจานเพาะเลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ 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 ด้วยกรด ซิตริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 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

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

ชั่งโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต 40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรตจนเป็นเนื้อเดียวกัน 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 ก.1 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 ก.2 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)

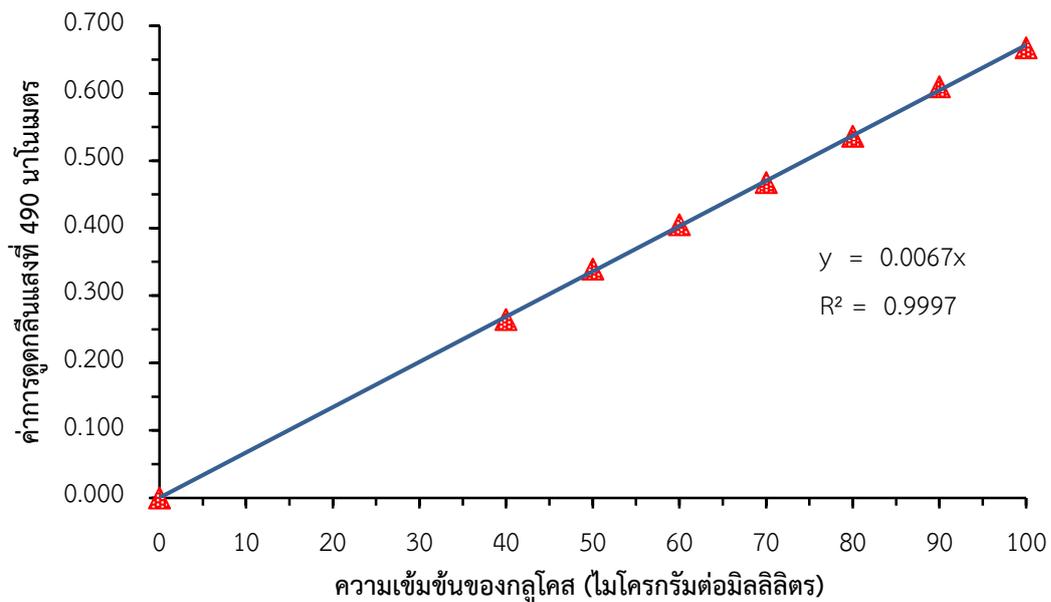
1 ปีเปดต์สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองให้ได้ความเข้มข้นของกลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 9

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

3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ตารางที่ ข.1 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 ข.1 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 ใส่หลอดทดลองให้ได้ความเข้มข้นของกลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 10

2 ปิเปตต์ DNS reagent 3 มิลลิลิตร ลงในสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ผสมให้เข้ากัน

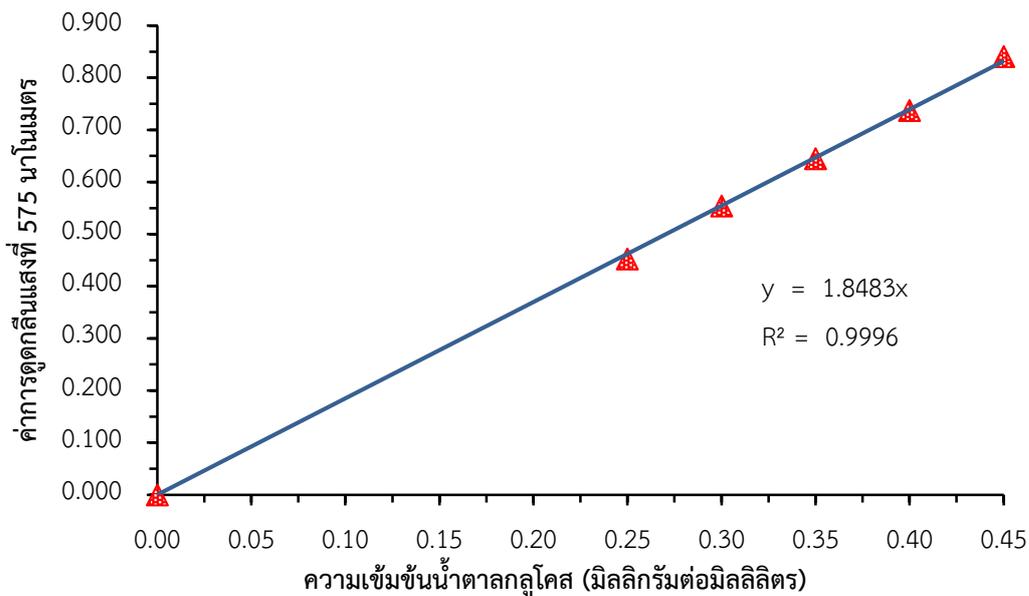
3 ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใช้พาราฟิล์มปิดหลอดทดลองให้สนิท

4 ปิเปตต์โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสในที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร

ตารางที่ ข.2 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 ข.2 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

จากกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ได้สมการ $y = 1.8483x$

โดย y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร

X คือ ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

สามารถคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดังนี้

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

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

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย) นางสาวนุชนาฏ เลี้ยงอำนวย
(ภาษาอังกฤษ) MISS NUCHANAT LAINGAUMNUAY
2. วัน เดือน ปีเกิด 7 มิถุนายน 2527
3. หมายเลขประจำตัวประชาชน 1 7302 00007 31 1
4. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน -
5. สถานที่ทำงาน
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
โทรศัพท์ 0-3430-0463, 086-1749796 โทรสาร 0-3430-0463
e-mail moo_woman@hotmail.com
6. ประวัติการศึกษา
ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ปีที่จบ พ.ศ. 2548
7. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา -
8. ความเชี่ยวชาญ -
9. ประสบการณ์งานวิจัย
 - Pipat Sudyng, Nuchanat Laingaumnuay 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.

ประวัติผู้วิจัย

ผู้ร่วมวิจัย

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- β -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 พุกษะศรี, 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 β -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

Pipat Sudying, 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.