การผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter xylinum* ที่อุณหภูมิสูง

นางสาวพันทิพา โพธิ์วัน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6649-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF CELLULOSE BY *Acetobacter xylinum* AT HIGH TEMPERATURE

Miss Pantipa Phowan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-6649-1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter xylinum* ที่อุณหภูมิสูง
โดย	นางสาวพันทิพา โพธิ์วัน
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร)

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

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พันทิพา โพธิ์วัน : การผลิต เซลลูโลสโดย *Acetobacter xylinum* ที่อุณหภูมิสูง.
(PRODUCTION OF *Acetobacter xylinum* AT HIGH TEMPERATURE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สุเมธ ตันตระเธียร, 107 หน้า. ISBN 974-17-6649-1

งานวิจัยนี้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูโลสได้จากผลไม้ต่างๆ 108 ไอโซเลต และพบว่าเชื้อ G9 G11 G16 R9 และ R9/2 สามารถผลิตเซลลูโลสได้ในอุณหภูมิสูง เมื่อทำการทดสอบทางชีวเคมีและทดสอบ 16s rDNA sequence เทียบกับเชื้อ Type strain พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลต เป็น *Acetobacter xylinum* ที่อุณหภูมิ 37°ซ และ 40°ซ เชื้อ G9 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ดี และที่ 42 °ซ สามารถเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ดีที่สุด จึงเลือกเชื้อนี้มาศึกษาผลของปริมาณสารอินทรีย์ต่อการผลิตแผ่นวุ้นเซลลูโลส โดยเติมน้ำตาลซูโครสในอาหารน้ำมะพร้าวที่มีปริมาณน้ำตาลอยู่ 3.07%(w/v) 0 1 3 และ 5%(w/v) แลคเตท 0 0.1 0.15 และ 0.2%(v/v) และเมไธโอนีน 0 0.0025 0.0050 และ 0.0075%(w/v) พบว่าเมื่อเติมน้ำตาลซูโครส 5%(w/v) เชื้อ G9 สร้าง แผ่นวุ้นหนาที่สุด เมื่อบ่มที่ 37°ซ 40°ซ และ 42 °ซ คือ 14.91 7.12 และ 5.79 มิลลิเมตร ผลผลิตเซลลูโลส 3.54 2.477 และ 1.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเติมแลคเตทปริมาณ 0.15 %(v/v) เชื้อสร้างแผ่นวุ้นที่ 37°ซ หนาสุด 15.03 มิลลิเมตร ผลผลิตเซลลูโลส 3.68 กรัมต่อลิตร และถ้าเติมแลคเตท 0.20 %(v/v) เชื้อสร้างแผ่นวุ้นที่ 40°ซ และ 42°ซ หนา 7.55 และ 4.12 มิลลิเมตร ผลผลิตเซลลูโลส 3.49 และ 2.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และการเติมเมไธโอนีน 0.0075%(w/v) เชื้อสร้างแผ่นวุ้นหนา 14.78 มิลลิเมตรที่ 37°ซ ผลผลิตเซลลูโลส 3.75 กรัมต่อลิตร การเติมเมไธโอนีน 0.0025%(w/v) เชื้อสร้างแผ่นวุ้นที่ 40°ซ และ42°ซ หนา 4.16 และ 3.85 มิลลิเมตร ผลิตเซลลูโลสได้ 2.05 และ 1.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการทดลองใส่สารอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดร่วมกันในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว พบว่า อาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำตาล 5%(w/v) แลคเตท 0.2%(v/v) และ เมไธโอนีน 0.005 %(w/v) เชื้อ G9 สามารถเจริญและให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด ที่อุณหภูมิ 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ ให้วุ้นหนา 15.55 8.56 และ 4.57 มิลลิเมตร ปริมาณเซลลูโลส 4.15 3.51 และ 2.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทดลองนำเชื้อ G9 มาเลี้ยงในอาหารน้ำชา พบว่า ให้ผลผลิตสูงกว่าเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าว และเมื่อแยกสารตามลำดับส่วนด้วยเทคนิค Gel filtration chromatography ได้ fraction ทั้งหมด 95 fraction และพบว่าที่มีผลต่อการผลิตเซลลูโลสของเชื้อคือ fraction ที่ 40 42 45 46 53 54 55 และ 56 ในขณะที่ fraction ที่ให้ผลดีที่สุดสำหรับการเจริญและผลิตเซลลูโลสคือ fraction ที่ 53 ซึ่งในลำดับนี้มีองค์ประกอบในรูปของโปรตีน น้ำตาลทั้งหมด และสารประกอบฟีนอลิก ในรูปของ gallic acid อยู่ในปริมาณ 0.019 0.134 และ 0.308 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

#4472348823: MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD:Acetobacter xylinum/HIGH TEMPERATURE/BACTERIAL CELLULOSE
PANTIPA PHOWAN : PRODUCTION OF CELLULOSE BY Acetobacter xylinum AT HIGH TEMPERATURE.THESIS ADVISOR: ASST.SUMATE TANTRATIAN, Ph.D., 107 pp.
ISBN 974-17-6649-1

The isolation of bacterial that have ability to produce cellulose gel was done. Out of 108 isolates, the isolates of G9, G11, G16, R9 and R9/2 were found to produce cellulose gel under high temperature. these 5 isolates were subjected to study the biochemical characteristics and analysed for 16s rDNA sequences. They were identifiled to be *Acetobacter xylinum*. The isolate G9 was found to be able to produce high amount of cellulose under 37-42 ^{o}C. It was chosen to study for the effect of various chemicals on the production of cellulose by the addition of chemicals to coconut medium, which contained total sugar 3.07%(w/v) at 0,2,5 and 8%(w/v) of sucrose: lactate at 0,0.1,0.15 and 0.20 (v/v) and methionine at 0, 0.0025, 0.005 and 0.0075 %(w/v). It was found that the addition of sucrose at 5%(w/v) produced the thickness pellicle of 14.91 7.12 and 5.79 millimeters, cellulose production 3.54 2.47 and 1.05 gram/litres at 37 40 and 42 ^{o}C,respectively. The addition of lactate at 0.15%(v/v) to the medium showed the thickness pellicle at 15.03 millimeters and cellulose production 3.68 gram/litres at 37^{o}C and addition of lactate at 0.20%(v/v) showed the thickness pellicle at 7.55 and 4.12 millimeters and cellulose production 3.49 and 2.25 gram/litres at 40 and 42^{o}C,respectively. The addition of methionine at 0.0075%(w/v) in the medium produced the thicknest pellicle of 14.78 millimeters and cellulose production 3.75 gram/litres at 37^{o}C and the concentration of 0.0025%(w/v) produced the thickness pellicle of 4.16 and 3.85 millimeters and cellulose production 2.055 and 1.25 gram/litres at 40 and 42^{o}C,respectively. The combination of these there effects were also studied. The isolate G9 was cultured in the coconut medium with the addition of 5%(w/v) sucrose,0.20%(v/v) lactate and 0.0075%(w/v) methionine under 42^{o}C. The isolate produced cellulose pellicle with the thickness of 15.55 8.56 and 4.57 millimeters and cellulose production 4.15 3.51 and 2.54 gram/litres at 37,40 and 42^{o}C,respectively. When cultured G9 on the medium contain tea leave extraction under high temperature. It was found to be able to produce higher amount of cellulose than cultured in coconut medium,the extraction of tea leaves was fractionated by gel filtration chromatography. There were 95 fractions collected. It was found that the fraction number 40,42,45,46,53,54,55 and 56 induced the production of cellulose gel in the basal medium, while the fraction 53 showed the highest production. The composition of this fraction was found to be compound of 0.019, 0.134 and 0.308 mg/l of protein, total sugar and phenolic as gallic acid,respectively.

Field of study Biotechnology Student's signature……
Acadamic Year 2004 Advisor's signature……

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นด้านวิชาการ และให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในการทำวิจัยจนสำเร็จ ตลอดจนช่วยตรวจทาน ปรับปรุงผลงาน แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ปรึกษา และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ รวมทั้งคำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำเทคนิคในการแยกเชื้อจากผลไม้

ขอกราบขอบพระคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้สถานที่ในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณโครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์ ทบวงมหาวิทยาลัย ภายใต้ความต้องการของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้มีส่วนสำคัญในการสนับสนุนข้าพเจ้าให้มีโอกาสเข้ามาศึกษาในสาขาวิชานี้ด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวก

ขอขอบพระคุณ คุณสมศรี ประชาศักดิ์ ตลาดบางลำภู ที่เอื้อเฟื้อน้ำมะพร้าวแก่ สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบตลอดการทดลอง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน ที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่และห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ และน้องๆ นิสิตปริญญาโททุกท่านที่ช่วยเหลือขณะทำการทดลองและให้กำลังใจ

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณคุณยาย คุณพ่อ คุณแม่ ผู้ให้การเลี้ยงดู อบรม และส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา และขอบคุณพี่สาว พี่ชาย เพื่อนๆ และน้องๆ จากชมรมลีลาศจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆเป็นอย่างดีเสมอ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ญ
สารบัญรูป.....ฎ

บทที่

1. บทนำ.....1
2. วารสารปริทัศน์.....3
    2.1 การจำแนกอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย.....3
    2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย.....4
    2.3 อาหารและการแยกเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย.....6
    2.4 เซลลูโลส.....7
        2.4.1 เซลลูโลสของจาก *Acetobacter xylinum*.....8
        2.4.2 การผลิตเซลลูโลส.....10
        2.4.3 การสังเคราะห์เซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*.....13
        2.4.4 ลักษณะทางกายภาพของเซลลูโลสและโครงสร้างของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่สร้างโดย *Acetobacter xylinum*.....17
    2.5 ชนิดของเซลลูโลสที่อะซิติกแอซิดแบคทีเรียสร้างได้.....19
    2.6 การนำเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* ไปใช้ประโยชน์.....19
    2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*.....20
    2.8 การหมักเพื่อผลิตเซลลูโลสด้วย *Acetobacter xylinum*.....26
    2.9 อิทธิพลของแลคเตทต่อการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*.....28
    2.10 ลักษณะและความสำคัญของชา.....29
        2.10.1 ความสัมพันธ์ระหว่างชากับ *Acetobacter xylinum*.....29
        2.10.3 องค์ประกอบสารที่สำคัญในชา.....31

3. วิธีการทดลอง.....34
3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....34
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....35
3.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียลเซลลูโลสจากแหล่ง.....35
3.2.2 การ Identified เชื้อที่แยกได้.....37
3.2.3 การคัดเลือก *Acetobacter xylinum* ที่ผลิตเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิสูง.....38
3.2.4 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *Acetobacter xylinum* ที่ผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูงที่อุณหภูมิสูงที่คัดแยกได้.....39
3.2.4.1 ศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสม.....39
3.2.4.2 ศึกษาปริมาณแลคเตทที่เหมาะสม.....39
3.2.4.3 ศึกษาปริมาณเมไธโอนีนที่เหมาะสม.....40
3.2.4.4 ศึกษาผลการทำงานร่วมกันของน้ำตาลซูโครส แลคเตท และเมไธโอนีนปริมาณเหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง.....41
3.2.5 การเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ในน้ำชาและหา fraction ที่แยกได้จากน้ำชา ซึ่งมีผลต่อการเจริญและสร้างเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง.....41
3.2.5.1 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อในอาหารน้ำชา เปรียบเทียบกับในอาหารน้ำมะพร้าว.....41
3.2.5.2 ศึกษาการแยกสารตามความแตกต่างของ Molecular weight จากน้ำชา โดยใช้เทคนิค gel filtration chromatography.....41
3.2.5.3 ศึกษาผลของแต่ละ fraction ที่แยกได้ต่อการเจริญและผลิตเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูง.....41
3.2.5.4 ศึกษาผลของ fraction ที่แยกได้ต่อการเจริญและผลิตเซลลูโลสเปรียบเทียบกับอาหารน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิสูง.....42
3.2.5.5 ศึกษาองค์ประกอบของ fraction ที่มีผลให้เชื้อเจริญและผลิตเซลลูโลสได้สูงสุด.....43
4. ผลการทดลองและวิจารณ์.....44
4.1 ผลการแยกเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิสูงจากผลไม้ต่างๆ.....44
4.2 ผลการ Identified เชื้อที่คัดแยกได้เพื่อยืนยันว่าเป็น *Acetobacter xylinum*.....45
4.3 การเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อที่แยกได้ที่อุณหภูมิสูง.....49

4.4 ผลของปริมาณสารอินทรีย์แต่ละชนิดต่อความสามารถในการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง.....52
4.4.1 ผลของปริมาณน้ำตาลซูโครสต่อการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ G9 อุณหภูมิสูง.....52
4.4.2 ผลของปริมาณแลคเตทที่เหมาะสมสำหรับเชื้อต่อการเจริญและสร้างเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูงสูง.....58
4.4.3 ผลของเมไธโอนีนต่อการเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูงสูง.....65
4.4.4 ผลการทำงานร่วมกันของน้ำตาลซูโครส แลคเตท และเมไธโอนีน ปริมาณที่เหมาะสมในการเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง.....72
4.5 ผลการเลี้ยงเชื้อในน้ำชา และหาfraction ที่แยกได้จากน้ำชาซึ่งมีผลต่อการเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง.....75
4.5.1 ผลการแยกสารตามความแตกต่างของ molecular weight จากน้ำชาและผลของ fraction ต่อการเจริญและสร้างเซลลูโลส.....76
4.5.2 ผล fraction ที่คัดเลือกได้ต่อการเจริญและผลิตเซลลูโลสในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว.....76
4.5.3 ผลองค์ประกอบของ fraction ที่แยกได้จากน้ำชา.....81
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....83
5.1 สรุปผลการทดลอง.....83
5.2 ข้อเสนอแนะ.....84
รายการอ้างอิง.....85
ภาคผนวก.....94
ภาคผนวก ก.....95
ภาคผนวก ข.....99
ภาคผนวก ค.....104
ภาคผนวก ง.....106
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....107

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แหล่งคาร์บอนสำหรับ *A. xylinum*. 22
2 องค์ประกอบของสารต่างๆในใบชาสด.....32
3. องค์ประกอบของสารต่างๆในยอดใบชาสด.....33
4. ผลการแยกเชื้อที่สร้างแผ่นวุ้นจากผลไม้ชนิดต่างๆ.....43
5. ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ 29 ชนิด เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *A. xylinum* TISTR893…45
6. ผลการตรวจสอบ 16s rDNA ของเชื้อที่คัดแยกได้.....47
7. การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....48
8. การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส.....49
9. การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส.....49
10 ผลการเลี้ยงเชื้อในอาหารน้ำมะพร้าวเปรียบเทียบกับในอาหารน้ำมะพร้าวที่ร่วมด้วยสารอินทรีย์.....73
11. การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* G9 ในอาหารน้ำมะพร้าวและน้ำชา.....74
12. การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* G9 ในอาหารน้ำมะพร้าวและอาหารน้ำมะพร้าวร่วมกับ fraction no.53 ที่แยกได้จากน้ำชา.....76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย.....5
2 โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส.....7
3. การเปรียบเทียบลักษณะเส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรียกับเส้นใยในพืชชั้นสูง โดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope.....10
4 วิถีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ และสารอนุพันธ์ของกรดอินทรีย์.....14
5 วิถีชีวเคมีของการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum*.....16
6 กลไกการสังเคราะห์เซลลูโลสโดย cellulose synthase 16
7 การรวมตัวของเส้นใยเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* 17
8 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทะลุผ่านของ P-fracture force lipopolysaccharide membrane.....18
9 ลักษณะการพันเส้นใยเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* 25
10 การผลิตเซลลูโลสจาก*Acetobacter xylinum* subsp. Sucrofermentan BPR 2001.....29
11. ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว.....44
12 จำนวนเซลล์ที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆที่ 37 องศาเซลเซียส.....52
13 ความหนาวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆที่37 องศาเซลเซียส.....52
14 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37° ซ เมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน 53
15 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 40° ซ เมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน.....53
16 ความหนาของวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 40° ซ.....54
17 จำนวนเซลล์ที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 40° ซ.....54

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

18 ความหนาของวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 42° ซ.....55
19 จำนวนเซลล์ที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 42° ซ.....56
20 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าว ที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 42° ซ เมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน.....56
21 ความหนาวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 37 ° ซ.....58
22 จำนวนเซลล์ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 37°ซ.....59
23 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงใอ อาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 37°ซ.เมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน.....59
24 จำนวนเซลล์ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 40°ซ.....60
25 ความหนาวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 40 ° ซ.....62
26 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 40°ซ เมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน.....62
27 ความหนาวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 42 ° ซ.....63
28 จำนวนเซลล์ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 42°ซ.....64
29 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 42°ซ.เมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน.....64
30 ความหนาของวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37°ซ.....66

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

31 จำนวนเซลล์ที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 37°ซ.....67
32 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงใน อาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 37°ซ.เมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน....67
33 จำนวนเซลล์ที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 40°ซ.....68
34 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงใน อาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 40°ซ เมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน....69
35 ความหนาวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงใน อาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 40°ซ.....69
36 ความหนาของวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำ มะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 42°ซ.....70
37 จำนวนเซลล์ที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 42°ซ.....71
38 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่เติมมเมไธโอนีนในปริมาณต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 42°ซ เมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน.....71
39 ผลจำนวนเซลล์ *Acetobacter xylinum* G9 ในอาหาร Basal medium +fraction ที่ได้จากการแยกสารในน้ำชาด้วยเทคนิค Gel chromatography 79
40 ผลความหนาแผ่นวุ้นเมื่อเลี้ยง *Acetobacter xylinum* G9 ในอาหาร Basal medium +fraction ที่ได้จากการแยกสารในน้ำชาด้วยเทคนิค Gel chromatography.....80
41 ปริมาณสารองค์ประกอบของ fraction no. 53 ที่แยกได้จากน้ำชา.....81

บทที่ 1

บทนำ

เซลลูโลส (cellulose) เป็นไบโอโพลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในโครงสร้างของพืช พืชแต่ละชนิดมีปริมาณเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกัน (Coffey and Bell, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่า สาหร่ายทะเล และเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์เซลลูโลสได้ เช่น *Achromobacter Agrobacterium Pseudomonas Rhizobium Sarcina* และ *Acetobacter* (Asai, 1968 และ Valla, 1995) เซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* หรือแบคทีเรียลเซลลูโลส (bacterial cellulose) เป็นแหล่งเซลลูโลสที่น่าสนใจ เพราะแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตเซลลูโลสที่บริสุทธิ์แตกต่างจากพืช คือปราศจากองค์ประกอบที่เป็น ลิกนิน (lignin) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และเพคติน (pectin) เมื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการแยกสกัดเซลลูโลส ทำให้สามารถลดระยะเวลา ปริมาณสารเคมี และพลังงานได้

Acetobacter xylinum เป็นเชื้อในกลุ่ม acetic acid bacteria เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่จัดอยู่ในแฟมิลี Acetobacteraceae เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (obligate aerobic) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยเฉพาะในผักและผลไม้ จุดเด่นคือสามารถสร้างเส้นใยเซลลูโลสที่มีลักษณะเหมือนกับเส้นใยที่ได้จากพืช แต่มีขนาดเล็กกว่า (Yoshinaga และคณะ ,1997) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย (Ross, Mayer และ Benziman,1991) โดยคุณลักษณะที่ต้องการคือ ต้องเป็นเชื้อที่ผลิตเซลลูโลสที่มีคุณภาพได้ในปริมาณมาก การนำเซลลูโลสไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ นำไปใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหารเพื่อเพิ่มกากใยในอาหาร (fibrous additive) โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์ประเภท low-calorie food ใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด (thickener) และใช้เป็นสารทดแทนไขมัน (fat replacer) การใช้ส่วนใหญ่อยู่ในรูปอนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose derivative) ได้แก่ methylcellulose hydroxypropylcellulose hydroxypropylmethylcellulose powdered cellulose และ microcrystalline cellulose (MCC) (Townsley, 1998) เป็นต้น (Lucca และ Tepper, 1994) ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* ได้แก่ สายพันธุ์ สารอาหารคาร์บอน สารประกอบไนโตรเจน และภาวะการแปรผันของเชื้อ ปริมาณอากาศหรือออกซิเจนในกระบวนการผลิต (Dudman ,1960) เป็นต้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า อุณหภูมิ เป็นปัจจัยหนึ่งและเป็นข้อจำกัดของการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อนี้ คือ ช่วงอุณหภูมิที่เชื้อใช้ในการผลิตเซลลูโลสที่ผ่านมานั้น อยู่ในช่วงแคบๆคือ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อสภาวะการเลี้ยงเชื้อมีช่วงอุณหภูมิสูงกว่านี้

ประสิทธิภาพการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อลดต่ำลง (Moonmangmee และคณะ,2002) ซึ่งเป็นอุปสรรคสำหรับการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม ที่เชื้อควรจะมีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสและเจริญได้ในระดับช่วงอุณหภูมิสูงกว่านี้เพื่อลดค่าใช้จ่ายในระบบการควบคุมอุณหภูมิ ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น สามารถเตรียมได้จากน้ำมะพร้าวและ/หรือน้ำชา โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องมีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมด้วย

สำหรับงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อ *Acetobacter xylinum* ที่มีความสามารถในการเจริญและผลิตเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิสูง รวมทั้งหาปัจจัยที่เกี่ยวข้องและสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อที่คัดแยกได้ เพื่อให้สามารถผลิตเซลลูโลสที่มีคุณภาพได้ในปริมาณสูง และทำการแยกสารที่มีค่า Molecular weight ต่างๆกัน จากน้ำชาและศึกษาผลของแต่ละ fraction ที่แยกได้ต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* ที่อุณหภูมิสูงเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการผลิตเซลลูโลสต่อไปในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

การศึกษาเกี่ยวกับอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย เริ่มต้นใจสมัยปลายศตวรรษที่ 18 โดยหลุยส์ ปาสเตอร์เป็นบุคคลแรก ต่อมาก็ได้มีการศึกษา ทั้งการแยก การพิสูจน์เอกลักษณ์ และการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้เรื่อยมา เช่น การศึกษาทางอนุกรมวิธานของเชื้อนี้ในประเทศญี่ปุ่น ทั้งทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์ (Yamada และคณะ. 1976; Yamada และคณะ,1983; Yamada และ Kondo, 1984; Entani และคณะ, 1985 และ Urakami และคณะ, 1989 เป็นต้น) รวมทั้งการใช้ประโยชน์ทั้งการผลิตกรดอะซิติกและเซลลูโลส (Toyosaki และคณะ, 1995 และ Minakami และคณะ, 1984 เป็นต้น)ในประเทศแถบยุโรปและอเมริกาก็ได้มีการศึกษาอนุกรมวิธานและการใช้ประโยชน์เช่นกัน (Gossele และคณะ, 1983 และ Mason และ Claus, 1989 เป็นต้น)สำหรับในประเทศไทยมีการแยก การพิสูจน์เอกลักษณ์ และการใช้ประโยชน์ของเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียมานานแต่ไม่ค่อยมีรายงานมากนัก (สมศรี ลิมปิพัฒนวิทย์, 2531 และ Saeki และคณะ, 1997)

2.1 การจัดจำแนกอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย

อะซิติกแอซิดแบคทีเรียจัดอยู่ในตระกูล Acetobacteraceae มีลักษณะเซลล์กลมรี จนถึงรูปร่างเป็นท่อน การเรียงตัวของเซลล์มีหลายลักษณะ อาจพบเซลล์อยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่ เรียงตัวเป็นสายยาวหรือเป็นสายสั้นๆไม่พบเอนโดสปอร์ (Endospore) เซลล์ติดสีแกรมลบ แต่เมื่อเซลล์อายุมากขึ้นอาจย้อมติดสีแกรมบวกบ้างเนื่องจากผนังเซลล์เปลี่ยนแปลงไป เชื้อกลุ่มนี้ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาชนิดรอบเซลล์หรือขั้วเซลล์ ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ (Pigment) แต่เมื่อมาอยู่รวมกันมากๆอาจเห็นเป็นสีชมพูของสารพอร์ไฟริน(Porphyrin) บางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล เชื้อกลุ่มนี้ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต(Obligate aerobe)เพราะไม่สามารถใช้สารอื่นนอกจากออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้ายในกระบวนการเปลี่ยนอาหารให้เป็นพลังงาน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อนี้จะแตกต่างกัน ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ 15-34 oซ เจริญได้ที่ความเป็นกรดด่าง 5.4-6.3 เจริญได้เล็กน้อยที่ความเป็นกรดด่าง 7-8 (De ley และ Frateur, 1974) มีผู้รายงานว่าพบเชื้อนี้ในผลไม้ น้ำส้มสายชู น้ำตาลสด น้ำตาลเมา กระแช่ ลูกแป้ง (นภา, 2520)

Acetobacter

ลักษณะของสกุลนี้คือ สามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและแลคเตท มีระบบยูบิควิโนนเป็นชนิด Q-9 ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีซอร์บิทอลหรือเมธานอลเป็นองค์ประกอบได้ จากตารางที่ 1 เชื้อสกุล Acetobacter แบ่งออกเป็น 5 สปีชีส์ ได้แก่

1. *A.aceti* ซึ่งแบ่งเป็น 2 subspecies ได้แก่ *A. aceti* subsp. *Aceti* และ *A. aceti* subsp. *Orleanensis* ซึ่งทั้งสองนั้นมีลักษณะที่แตกต่างกันคือ การเจริญได้ใน Hoyer-Frateur agar โดย *A. aceti* subsp. *Aceti* จะให้ผลเป็นบวก ส่วน *A. aceti* subsp. *Orleanensis* จะให้ผลเป็นลบ (Yamada และคณะ, 1997)

2. *A. pasteurianus* ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 subspecies ได้แก่ *A. pasteurianus* subsp. *pasteurianus* , *A. pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *A. pasteurianus* subsp. *estunensis*, *A. pasteurianus* subsp. *ascendens* และ *A. pasteurianus* subsp.*paradoxus* (Yamada และคณะ, 1997)

3. *A. peroxydans*

4. *A.polyoxogenes*

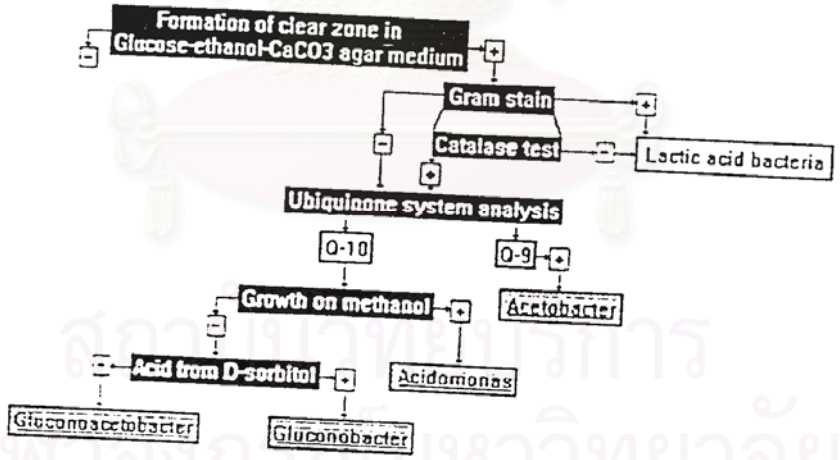
5. *A. methanolicus* มีรายงานพบว่าในการผลิตน้ำส้มสายชูจาก Acetobacter sp. เมื่อมีการเติมกรดคาซามิโนซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้การเจริญของเชื้อ Acetobacter บางสายพันธุ์เจริญดีมากขึ้นและผลิตกรดอะซิติกได้มากขึ้น (Mori และ Harada, 1973)

Gluconoacetobacter

ลักษณะที่สำคัญของเชื้อกลุ่มนี้คือ มีระบบยูบิควิโนนชนิด Q-10 และไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเมธานอลหรือดี-ซอร์บิทอลเป็นองค์ประกอบ (Yamada และคณะ,1997) เชื้อสกุล *Gluconoacetobacter* นี้แบ่งได้เป็น 5 สปีชีส์ คือ 1.) *Gluconoacetobacter europaeus,* 2.) *Gluconoacetobacter xylinus*, 3.) *Gluconoacetobacter hansenii*, 4.) *Gluconoacetobacter liquefaciens และ* 5.) *Gluconoacetobacter diazotrophicus* และพบความแตกต่างอย่างชัดเจนภายในเชื้อสกุลนี้ คือ *Gluconoacetobacter liquefaciens* และ *Gluconoacetobacter diazotrophicus* สามารถผลิตสีน้ำตาลได้และลักษณะที่แยกระหว่าง 2 สปีชีส์นี้คือ การสร้างกรด 5-คีโตกลูโคนิค การเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 30% และที่สำคัญที่สุดในการแยกสปีชีส์ *Gluconoacetobacter diazotrophicus* ออกจากสปีชีส์อื่นๆคือ สามารถตรึงไนโตรเจนได้ และ ยังสามารถเจริญในอาหารที่มีกรดอะซิติกสูงถึง 10% ได้และเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ 2.5 สำหรับ สปีชีส์ *Gluconoacetobacter xylinus (Acetobacter xylinum)*นั้นมีลักษณะที่สำคัญคือ สามารถผลิตเซลลูโลส รวมทั้งเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้

2.2 **การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย** (Identification of Acetic Acid Bacteria)

การพิสูจน์เอกลักษณ์นั้นมีความสำคัญในการที่จะระบุว่าเชื้อที่แยกได้จัดอยู่ในกลุ่มใด Yamada และคณะ (1997) ได้พิสูจน์เอกลักษณ์ในการจำแนกสกุลของเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งได้จากแหล่งต่างๆและได้พบเชื้อที่สามารถผลิตกรดในผลไม้จะมีอะซิติกแอซิดแบคทีเรียและแลคติกแอซิดแบคทีเรียปะปนกัน ดังนั้น จึงอาจแยกเชื้อ 2 กลุ่มนี้ออกจากกันโดยอาศัยลักษณะที่แตกต่างกันนั่นคือ การย้อมแกรมและการทดสอบคาตาเลส ซึ่งอะซิติกแอซิดแบคทีเรียให้ผลตรงกันข้าม เมื่อได้เชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียแล้ว จะนำมาจัดกลุ่มได้โดยอาศัยการวิเคราะห์ระบบยูบิควิโนน สายพันธุ์ใดให้ผลเป็นยูบิควิโนนชนิด Q-9 จะจัดอยู่ในสกุล Acetobacter แต่ถ้าเป็นชนิด Q-10 จะนำมาศึกษาความสามารถในการเจริญและผลิตกรดในอาหารที่มีเมธานอลเป็นองค์ประกอบต่อไป โดยถ้าให้ผลเป็นบวกจะจัดอยู่ในสกุล Acidomonas แต่ถ้าให้ผลเป็นลบจะนำมาศึกษาความสามารถในการเจริญและผลิตกรดในอาหารที่มีซอร์บิทอลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งถ้าให้ผลบวกจะจัดอยู่ในสกุล Gluconobacter แต่ถ้าให้ผลเป็นลบจะจัดอยู่ในสกุล Gluconoacetobacter ซึ่งการจำแนกเชื้อกลุ่มนี้ในระดับสกุล(Yamada และคณะ, 1997) แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย
ที่มา : Yamada และคณะ, 1997.

2.3 อาหารและการแยกเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย (Nutrients and Isolation of Acetic Acid Bacteria)

สารอาหารจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อกลุ่มนี้ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ Swing(1992) ได้มีการแยกเชื้อ *Gluconoacetobacter xylinus (Acetobacter xylinum)* จากผลไม้ชนิดต่างๆ โดยใช้อาหาร GY-broth และมีการเติมไซโคลเฮกซาไมด์ (Cyclohexamide) เพื่อป้องกันการเจริญของยีสต์และรา จากนั้นนำมาทำการแยกเชื้อในอาหาร GCY-agar

Asai และคณะ (1964) ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย โดยศึกษาทางชีวเคมีของการเกิดออกซิเดชัน(Oxidation)ของเอธานอล โพลีแอลกอฮอล์ และน้ำตาล โดยเชื้อในสกุล *Gluconobacter* ได้นำมาเลี้ยงใน Manitol agar และสำหรับสกุล *Acetobacter* ได้นำมาเลี้ยงใน GYP-agar

Yamada(1968) ได้ทำการศึกษาระบบยูบิควิโนนของเชื้อในสกุล *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ซึ่งเชื้อสกุล *Acetobacter* นำมาเลี้ยงในอาหาร GEK-broth ส่วนเชื้อสกุล *Gluconobacter* เลี้ยงในอาหาร GAPY-broth แล้วทำการสกัดสารยูบิควิโนนต่อไป Yamada ในปี 1969ได้ทำการศึกษาระบบยูบิควิโนนของเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียโดยเลี้ยงเชื้อสกุล *Gluconobacter* และ *Acetobacter* ในอาหาร GAPYC-broth

Jesus และคณะ (1971) ได้ศึกษาการแยกเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้ในอาหาร TPSS-broth ภายหลังจากการแยกเชื้อได้ศึกษาความสามารถในการผลิตเซลลูโลสโดยใช้อาหาร coconut-water

Mori และ Harada (1973) ได้ศึกษาแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ *Acetobacter rancens* S3, F11 ซึ่งแยกได้จากการหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้อาหาร basal medium

Yamada และคณะ (1976) ได้ทำการแยกเชื้อจากผลไม้ โดยใช้อาหาร GAEYP-broth และ GAEYP-agar และเก็บเชื้อที่แยกได้บนอาหาร GGYP-agar

Colvin และคณะ (1977) ได้ศึกษาการสร้างกลูแคนของเชื้อ *Acetobacter xylinum*ในอาหาร GCC-broth

Ohmori และคณะ (1980) ได้ทำการแยกเชื้อในน้ำส้มสายชูและผลไม้ชนิดต่างๆ ในประเทศญี่ปุ่นเพื่อหาเชื้อสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำส้มสายชูได้ที่อุณหภูมิสูง โดยใช้อาหาร YG-broth และ YGM-broth ผลปรากฏว่าได้ *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* ซึ่งมีคุณสมบัติดี คือ สามารถผลิตกรดได้ที่อุณหภูมิสูง

Yamada และคณะ (1981) ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ (Cellular fatty acid) ของอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย ในการเตรียมเซลล์โดยใช้อาหาร GGPY-broth

Carigliano (1982) ศึกษาอาหารที่ใช้แยกความแตกต่างโคโลนีระหว่างสกุล *Acetobacter* และสกุล *Gluconobacter* โดยใช้อาหาร DMS-agar

Masaoka และคณะ (1993) ได้ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Gluconoacetobacter xylinus (Acetobacter xylinum)* โดยใช้อาหาร PYG-broth

Toyosaki และคณะ (1995) ได้พยายามแยกเชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสในภาวะเขย่า โดยใช้อาหารดังนี้ YE-broth, BSH-broth และ CSL-Fru broth

2.4 **เซลลูโลส** (cellulose)

เซลลูโลส เป็นโพลีแซคคาไรด์มีชื่อทางเคมีว่า 1,4-β-D-polyanhydroglucopyranose โครงสร้างของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส 15-40,000 หน่วย ต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β-(1,4) glycosidic (Coffey และ Bell ,1995) (รูปที่ 2) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบของเซลลูโลสซึ่งมีค่าประมาณ1,500,000ดาลตัน (Brown และคณะ, 1976)

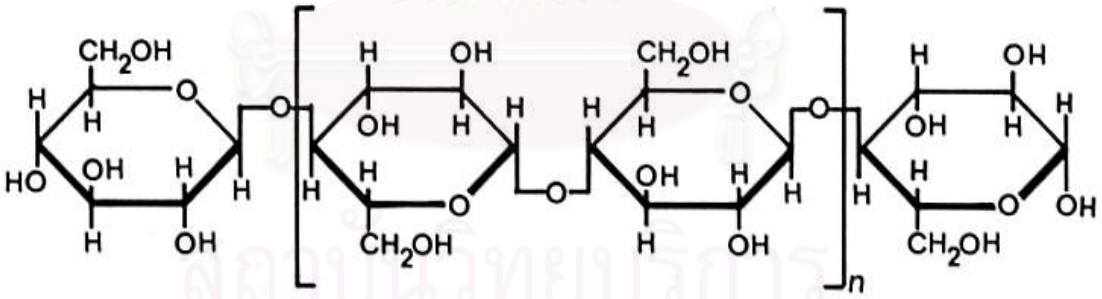


Fig. 1. The chemical structure of cellulose. The disaccharide, cellobiose, is the basic repeat unit and is enclosed in brackets.

รูปที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส

ที่มา : Coffey และ Bell (1995)

2.4.1 เซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum*

Acetobacter aceti subsp. *xylinum* หรือ *Acetobacter xylinum* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Acetic acid bacteria *A. xylinum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในแฟมิลี Acetobacteraceae เซลล์มีลักษณะรูปร่างยาวรี (rod) อาจเป็นท่อนตรงหรือโค้ง อยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสาย ขนาดเซลล์กว้างประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน ยาวประมาณ 1.0-1.4 ไมครอน ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ต้องการอากาศในการเจริญ(obligate aerobic) โดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการเปลี่ยนสารอาหารให้เป็นพลังงานสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase enzyme) ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติก ออกซิไดซ์กรดอินทรีย์ประเภทอะซิเตทและแลคเตท เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ พบทั่วไปในธรรมชาติโดยเฉพาะในผักและผลไม้ จุดเด่นคือ สามารถผลิตเซลลูโลสได้ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือพีเอชประมาณ 5.4-6.3 และอุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นสารประเภทเอธานอล แลคเตท กลูโคส ซูโครส ฟรุกโตส แมนนิทอล และอะราบิโนส ในระหว่างการเจริญของเชื้อชนิดนี้จะมีการสร้างเส้นใยเซลลูโลสซึ่งจัดเป็น primary metabolic product อุณหภูมิที่สามารถทำลายเชื้อชนิดนี้คือ 65-70 องศาเซลเซียส (Breed และคณะ, 1957 และ Asai,1968) เส้นใยเซลลูโลสที่ *A. xylinum* สร้างขึ้นจะมีลักษณะเป็นแผ่นวุ้นสีขาว หรือครีมลอยอยู่ที่ผิวหน้าของอาหาร

คุณลักษณะของเชื้อที่ต้องการคือ เป็นเชื้อที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้ในปริมาณมาก และเซลลูโลสที่ได้มีประสิทธิภาพดี ส่วนข้อจำกัดของการผลิตเซลลูโลสโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตนั้น มีค่อนข้างมาก ทั้งในเรื่องของการควบคุมกระบวนการผลิตให้เหมาะสมกับลักษณะของเชื้อแต่ละชนิด สภาวะที่เหมาะสมอาจกล่าวรวมถึง อาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่าง แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการ จะต้องเหมาะสมกับเชื้อ *A. xylinum* ที่ใช้

จากการศึกษาโดยใช้วิธี X-ray diffraction พบว่า โครงสร้างของเซลลูโลสจาก*A. xylinum* ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า microfibril มีขนาดความกว้างประมาณ 1-25 นาโนเมตร ประกอบไปด้วยสาย polyglucosan ตั้งแต่ 10-250 สาย มีความยาวประมาณ 1-9 ไมครอน มีหน่วยย่อยกลูโคสประมาณ 2,000-18,000 หน่วย microfibril อยู่ในลักษณะเป็นสายยาวเรียงขนานกัน แต่ละสายจะเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจน รวมอยู่เป็นมัดมีลักษณะเป็นเส้นใยเล็กๆ เรียกว่า cellulose fibril และเมื่อใช้เครื่อง transmission electron microscope ตรวจสอบเส้นใยเซลลูโลส (cellulose fibril) พบว่า มีขนาดความกว้างประมาณ 100 นาโนเมตร และหนา

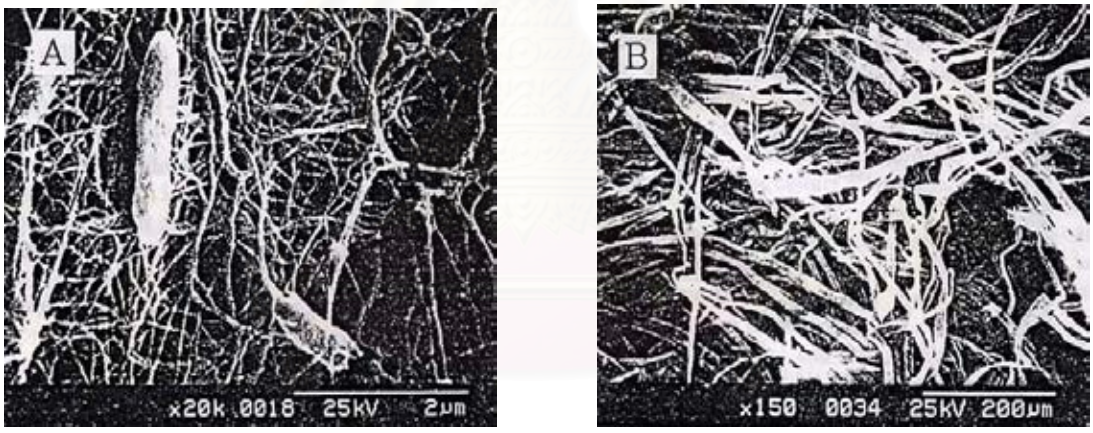
ประมาณ 3-8 นาโนเมตร มีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของพืชชั้นสูง และเส้นใยสังเคราะห์ประมาณ 10-1,000 เท่าและ 100 เท่า ตามลำดับ (Yoshinaga และคณะ, 1997)

สมบัติของแผ่นวุ้นเซลลูโลสจาก *A.xylinum* ได้แก่

1. มีความเป็น hydrophilic สูง เนื่องจากการมีพื้นที่ในโครงสร้างมากจึงสามารถอุ้มน้ำ (water holding capacity) สูงถึง 60-700 เท่าของน้ำหนักแห้ง (White และ Brown, 1989)

2. ไม่มีเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) และ เพคติน (pectin) เจือปน ทำให้ง่ายต่อการนำไปทำให้บริสุทธิ์ ส่วนปริมาณเซลลูโลสของแผ่นวุ้นจาก *Acetobacter xylinum* มีปริมาณเท่ากับ 1.10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเปียก ซึ่งมากกว่าปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากแหล่งผลไม้ต่างๆ เช่น ในสับปะรด มะละกอ เนื้อมันเทศ และมะม่วง ซึ่งมีปริมาณเซลลูโลสเท่ากับ 0.37 0.72 0.76 และ 0.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Lund และ Smoot, 1982)

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



รูปที่ 3 การเปรียบเทียบลักษณะเส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรียกับเส้นใยในพืชชั้นสูง โดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope

A : เซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* B : เซลลูโลสจากพืช

ที่มา : Yoshinaga และคณะ (1997)

2.4.2 การผลิตเซลลูโลส

ปัจจุบันแหล่งเซลลูโลสที่ใช้กันส่วนใหญ่ได้มาจากพืชชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังได้จาก อะมีบา ราเมือก สาหร่ายทะเล และแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas, Achomobacter, Aerobacter*, *Rhizobium, Agrobacter, Azotobacter และ Acetobacter* โดยเฉพาะ *Acetobacter xylinum* ได้รับความสนใจกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เนื่องจากเส้นใยเซลลูโลสมีขนาดเล็กมาก ไม่มีการเจือปนของเฮมิเซลลูโลส ลิกนินและเพกติน เส้นใยมีความเป็น hydrophilic สูง เนื่องจากการมีพื้นที่ผิวในโครงสร้างมากจึงอุ้มน้ำได้สูงถึง 60-700 เท่าของน้ำหนักแห้ง เส้นใยทนต่อแรงดึงได้สูงกว่าไฟเบอร์สังเคราะห์ต่างๆ จึงมีการนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง เช่น กระดาษลำโพง ผิวหนังเทียม และสารเติมแต่งในอาหาร (Okiyama, Motoki และ Yamanaka, 1987) เป็นต้น

การใช้ประโยชน์ของเซลลูโลสจากเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียมีด้วยกัน 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ เพื่อการบริโภค เช่น Nata de coco ซึ่งควรจะมีเนื้อสัมผัสที่ดีเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค และเพื่อใช้ในทางอุตสาหกรรมผลิตเซลลูโลส เช่น การทำเยื่อกระดาษ เป็นต้น เซลลูโลสจากเชื้อแบคทีเรียมีข้อดีด้วยกันหลายประการเช่น มีความบริสุทธิ์สูงและยังช่วยลดการใช้ไม้ลง เป็นการช่วยลดมลพิษจากการที่จะเกิดน้ำเสียจากขั้นตอนการทำไม้ให้เป็นเยื่อกระดาษไนทางอ้อม มีงานวิจัยที่ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวโดยใช้เชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 86 (สมศรี ลิปีพัฒนวิทย์, 2531)

Masaoka,Ohe และ Sakoto (1993) ทำการทดลองเลี้ยง *Acetobacter xylinum* IFO 13693 ในอาหารสังเคราะห์ในภาชนะที่ติดตะแกรงมีรูขนาด 22 ไมครอนในตำแหน่งที่ต่ำกว่าผิวหน้าของอาหารเหลวเท่ากับ 11 มิลลิเมตร เมื่อเลี้ยงนาน 4 วันพบว่ามีการสร้างเซลลูโลสที่ผิวหน้าอาหารเหลว แต่ไม่มีการสร้างเซลลูโลสในอาหารที่อยู่ภายใต้ตะแกรงเลย แสดงว่ามีเฉพาะเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ใกล้ผิวหน้าอาหารเหลวเท่านั้นที่สร้างเซลลูโลส เนื่องจาก *Acetobacter xylinum* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญและการที่อาหารเหลวใสขึ้นในเวลาเดียวกับการปรากฏของแผ่นวุ้นบนผิวหน้าของอาหารเหลว ดังนั้นจึงมีการสันนิษฐานว่าแผ่นวุ้นดังกล่าวทำหน้าที่พาเซลล์แบคทีเรียขึ้นสู่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนสูงกว่าโดยอาศัยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิสมของแบคทีเรียและถูกกักเก็บไว้ในโครงสร้างที่เป็นร่างแหเซลลูโลสของแผ่นวุ้น

Schramm และ Hestrin (1954) พบว่าเชื้อจะสร้างชั้นของแผ่นวุ้นใหม่ขึ้นบนผิวหน้าของแผ่นวุ้นด้านที่สัมผัสกับอากาศและชั้นของแผ่นวุ้นเก่าจะจมลงสู่ด้านล่าง แผ่นวุ้นที่ได้จึงมีลักษณะเป็นชั้นของร่างแหเซลลูโลสจำนวนมากซ้อนทับกันอยู่ เนื่องจากการสร้างเซลลูโลสในการหมักแบบ

วางนิ่งจะเกิดเฉพาะที่ผิวหน้าของอาหารเหลวซึ่งสัมผัสกับอากาศเท่านั้น ดังนั้นปริมาณเซลลูโลสที่เชื้อสร้างขึ้น จึงเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่ขึ้นกับปริมาตรและความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ Masaoka,Ohe และ Sakoto (1993) อัตราการสร้างผ่านวุ้นและเซลลูโลสของเชื้อขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของเชื้อ อายุและปริมาณของหัวเชื้อตั้งต้น ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ระยะเวลาในการเลี้ยงและพื้นที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นต้น อย่างไรก็ตามความหนาของแผ่นวุ้นจะเพิ่มขึ้นด้วยอัตราเร็วเกือบคงที่ในช่วง 2-5 วันแรกของการเลี้ยง และจะลดลงในวันต่อๆมา (อังคณา พันธ์ศรี, 2541) ในขณะที่อัตราการสร้างเซลลูโลสของเชื้อจะสูงสุดในระยะ 8 วันแรกของการเลี้ยงและจะลดลงหลังจากนั้น แม้ว่า 70-75% ของปริมาณเซลลูโลสที่เชื้อสร้างทั้งหมดจะสร้างขึ้นในช่วง 8-9 วันแรกของการเลี้ยง แต่เชื้อจะยังคงสร้างเซลลูโลสในอัตราการผลิตที่ต่ำกว่าได้เรื่อยๆ จนถึงวันที่ 46 ของการเลี้ยง (Dudman,1959; Embuscado, Marks และ BeMiler, 1994 และ Masaoka และคณะ, 1993)

Moonmangmee และคณะ (2002) ได้ศึกษาการแยกเชื้อ การทดสอบลักษณะของเชื้อและความสามารถในการผลิตเส้นใยเซลลูโลสของเชื้อที่เป็น Thermotolerant *Acetobacter* Strain โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 37 40 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการศึกษามากขึ้นจาก 37 เป็น 40 และ 42 องศาเซลเซียส มีผลทำให้อัตราการเจริญของเชื้อลดลง และอัตราของการผลิตเส้นใยเซลลูโลสก็ลดลงด้วย

Saeki และคณะ (1997) ศึกษากระบวนการผลิต น้ำส้มสายชู จากเชื้อแบคทีเรีย Acetic acid bacteria พบว่า อุณหภูมิเป็นตัวจำกัดประสิทธิภาพในการผลิตน้ำส้มสายชู เนื่องจาก Acetic acid bacteria ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูนั้นมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตค่อนข้างต่ำ คือ จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 25-30 °ซ ซึ่งถือเป็นอุปสรรคในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งมีอุณหภูมิในระบบค่อนข้างสูง ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มมากขึ้นในกระบวนการ พบว่า Thermotolerant Acetic acid bacteria สามารถลดปัญหาได้ ทำให้สามารถผลิตน้ำส้มสายชูได้ที่ช่วงอุณหภูมิสูงขึ้น ลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการได้มาก

Dudman (1960) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* สายพันธุ์ต่างๆ ในสภาวะนิ่งกับสภาวะเขย่า พบว่า การผลิตเซลลูโลสในสภาวะผิวนิ่งมีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์และผลผลิตเซลลูโลส (cellulose yield) เกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำกว่าการผลิตในสภาวะเขย่า เนื่องจากระยะเวลาในการผลิตนานกว่า แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศโดยการเขย่าพบว่า ผลผลิตเซลลูโลสลดลง ซึ่งทำการแก้ไขโดยการเติม neutralizing agent

Naritomi และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสโดยเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR30011A ในอาหาร fructose Corn Steep Liquor(Fru-CSL)ที่มี

ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตส 30 กรัมต่อลิตร ค่าออกซิเจนที่ละลาย (dissolve oxygen) 10% ค่า pH 5.0 และอัตราการเติมอาหารในถังหมักที่อัตราการเจือจางระหว่าง 0.03-0.10 ต่อชั่วโมง พบว่า อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.07 ต่อชั่วโมง ให้อัตราการผลิตเซลลูโลสสูงที่สุดเท่ากับ 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่เมื่ออัตราการเจือจางและความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสเพิ่มขึ้น ทำให้ผลผลิตเซลลูโลสลดลง เมื่อเติมแลกเตทในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 12.5 กรัมต่อลิตร พบว่าที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.1 ต่อชั่วโมง การเจริญของเซลล์และการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ที่อัตราการผลิต 0.90 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 36 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปลี่ยนจากแลคเตทมาเป็นเอทานอลปริมาณ 10.0 กรัมต่อลิตร พบว่า การเจริญของเซลล์และการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้นในอัตราการผลิต 0.95 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 46 เปอร์เซ็นต์

Jesus (1971) ได้ศึกษาการแยกเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้จากผัก ผลไม้ และน้ำส้มสายชู และพิสูจน์เอกลักษณ์จัดเป็น *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*

Colvin และคณะ (1977) ได้พบสารโพลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้จากสายพันธุ์ *Acetobacter xylinum* ซึ่งประกอบด้วยสายกลูโคสเป็นเส้นตรงและมีกิ่งที่ต่อด้วยพันธะ β-1-4 ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของทุกๆกลูโคสสายตรง

Volla และ Kjosbakken (1981) *Acetobacter xylinum* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดใหม่ ซึ่งโพลีแซคคาไรด์ที่ได้นี้ประกอบด้วย กลูโคส:แมนโนส:แรมโนส:กรดกลูโคนิค ในอัตราส่วน 3:1:1:1 โดยประมาณ Minakami และคณะ (1984) ได้พบ อะซิติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างโพลีแซคคาไรด์ชนิดใหม่ ซึ่งแยกได้จากกากน้ำส้มสายชูซึ่งเป็นสกุล *Acetobacter* โพลีแซคคาไรด์ที่ได้ประกอบด้วย กลูโคส:กาแลกโทส: แมนโนส: กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) ในอัตราส่วน 6:2:1:1 โดยปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโพลีแซคคาไรด์นั้นขึ้นอยู่กับน้ำตาลที่ใช้เลี้ยงเชื้อด้วย

Gossele และ Swings (1985) ได้ศึกษาการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อบางสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้พบว่าเป็นสายพันธุ์ *Acetobacter hansenii* นอกจากนี้ Ammemura และคณะ (1985) พบการสร้างสารกลูแคน (glucan) ปริมาณ 2-2.5 มก. ต่อ 100 มล. จากเชื้อ *Acetobacter xylinum* IFO 3288, IFO 13693 และ IFO 13772, *Acetobacter aceti* IFO 3281 และ 3283, *A.pasteurianus* IFO 3223 และ *A. rancens* IFO 3297 และยังพบว่า *Acetobacter xylinum* สามารถสร้างโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย ดี-กลูโคส แอล-แรมโนส และกรดกลูคูโรนิค ในอัตราส่วน 7:8:1 Savidge และ Colvin (1977) ได้ศึกษาการผลิตเซลลูโลสและโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้จาก *Acetobacter xylinum* โพลีแซคคาไรด์ประกอบด้วย กลูโคส: แรมโนส: แมนโนส: กรดกลูคูโรนิค ในอัตราส่วน 6:1:1:1 ส่วน Tayama และคณะ(1985) ได้พบโพลีแซคคาไรด์

จากเชื้อ *Acetobacter xylinum* ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส: แรมโนส : แมนโนส : กรดกลูคูโรนิค : ออร์โท-อะซิติล(O-acetyl) ในอัตราส่วน 4:1:1:1:1

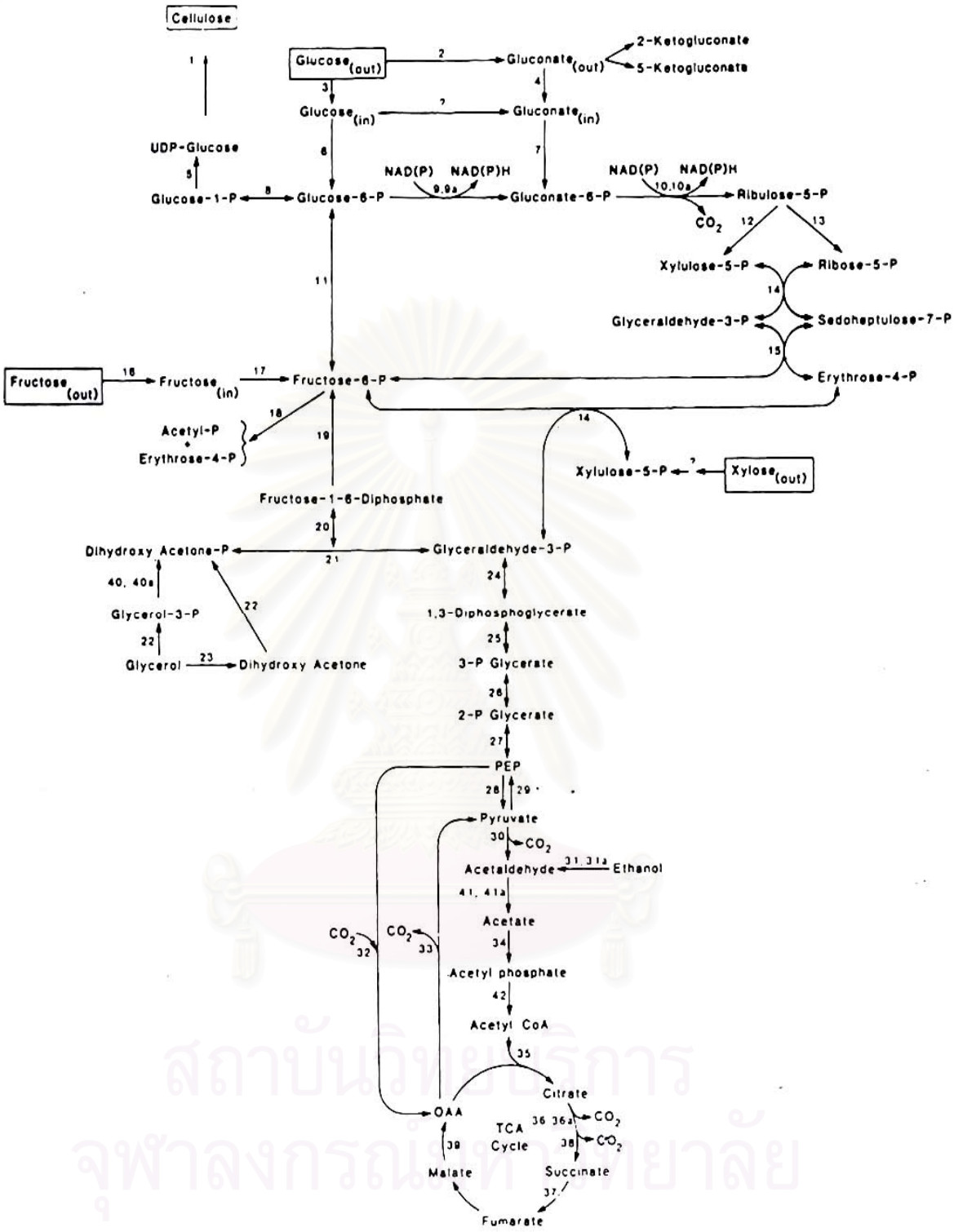
Masaoka และคณะ (1993) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* และพบว่าพื้นผิวที่สัมผัสกับอากาศมีผลต่อการผลิตเซลลูโลส ซึ่งถ้ายิ่งมีพื้นที่ผิวมากก็จะทำให้การผลิตเซลลูโลสเป็นไปได้มาก Toyasaki และคณะ (1995) ได้ทำการแยกเชื้อจากผลไม้ชนิดต่างๆ เพื่อหาสายพันธุ์ที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงในภาวะเขย่า เพื่อต้องการเซลลูโลสปริมาณสูงในเวลาสั้น เพื่อนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ซึ่งได้สายพันธุ์ BPR 2001 ที่ยังไม่ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงถึง 7.7 กรัมต่อลิตร ใน jar fermenter ในอาหาร CSL-Fru broth

2.4.3 การสังเคราะห์เซลลูโลสของ *A. xylinum*

กลไกการสังเคราะห์เซลลูโลสของ *A. xylinum* ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนที่สำคัญ ได้แก่

2.4.3.1 การสังเคราะห์ sugar nucleotide precursor *Acetobacter xylinum* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตเซลลูโลสได้หลายชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส ไซโลส อะราบิโนส ซูโครส สตาร์ช กลีเซอรอล และ ดี-กลูโคโนแลคโตน เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่สามารถเข้าสู่วิถีเมตาบอลิซึมหลัก ได้แก่ pentose phosphate pathway สำหรับสารตั้งต้นที่เป็นคาร์โบไฮเดรท และ tricarboxylic acid cycle (TCA) สำหรับกรดอินทรีย์และอนุพันธ์ของกรดอินทรีย์ (Ross และคณะ, 1991) (รูปที่ 4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 วิถีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ และสารอนุพันธ์ของกรดอินทรีย์

ที่มา : Ross และคณะ (1991)

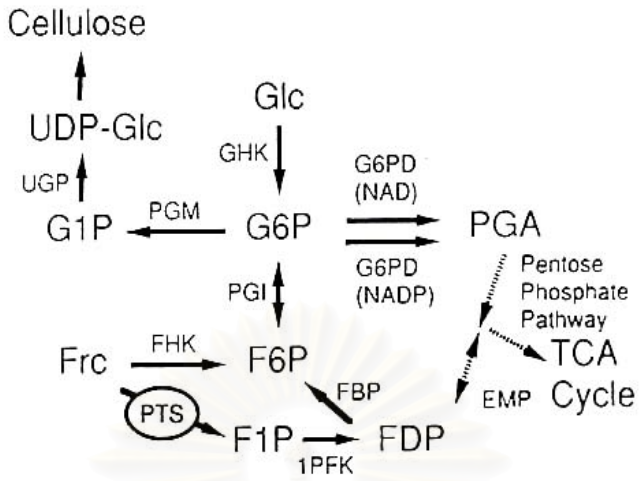
เมื่อสารที่ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนผ่านวิถีเมตาบอลิซึมหลักแล้วจะเกิดสาร uridine diphosphate glucose (UDP-G) หรือ sugar nucleotide precursor ซึ่งจะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์เซลลูโลส

จากรูปที่ 5 glucose จะถูกเปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate (G6P) โดยเอนไซม์ glucose hexokinase (GHK) จากนั้นจะเริ่มกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสโดย G6P จะถูกเปลี่ยนเป็น glucose-1-phosphate (G1P) โดยเอนไซม์ phosphoglucomutase (PGM) และ G1P จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น uridine diphosphate glucose (UDP-G) โดยเอนไซม์ glucose pyrophosphorylase (UGP) จากนั้น UDP-G จะถูกนำมาต่อกันเป็นสายของเซลลูโลส หรือ β-1,4-glucan chain โดยการทำงานของเอนไซม์ cellulose synthase บน plasma membrane ของ *Acetobacter xylinum* (Yoshinaga และคณะ,1997)

2.4.3.2 การสังเคราะห์เซลลูโลสโดยเอนไซม์ cellulose synthase การสังเคราะห์เซลลูโลสเริ่มจากเอนไซม์ diguanylate cyclase เปลี่ยน guanosine triphosphate (GTP) 2 โมเลกุล ให้เป็น diguanosine tetraphosphate (pppGpG) ซึ่งเป็น dinucleotide tetraphosphate โดยมีการปล่อย diphosphate (ppi) จากนั้นจึงเปลี่ยน pppGpG ให้เป็น diguanosine diphosphate (pGpG) โดยมีการปล่อย ppi เช่นเดียวกัน แล้วจึงเปลี่ยน pGpG ไปในสองทิศทาง โดยทิศทางแรกเอนไซม์phosphodiesterase-A (PDE-A) ตัดพันธะ phosphodiester bond ในโครงสร้าง pGpG ได้ pGpG สายตรงซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่ active จากนั้น pGpG จะถูกเปลี่ยนไปเป็น 5'-GMP โดยเอนไซม์ phosphodiesterase-B (PDE-B) ทิศทางที่สองจะเกิดขึ้นเมื่อมี Ca^{2+} ยังยั้งการทำงานของเอนไซม์ PDE-A ทำให้ pGpG ถูกเปลี่ยนไปเป็นสาย β-1,4-glucan chain (รูปที่ 6) โดยเอนไซม์ cellulose synthase ซึ่งจะไปเร่งการปลดปล่อยโมเลกุลของ glucose โมเลกุลของ glucose ที่ปลดปล่อยจะรวมตัวอยู่ในสารละลาย (Ross และคณะ ,1991) ดังแสดงในสมการ

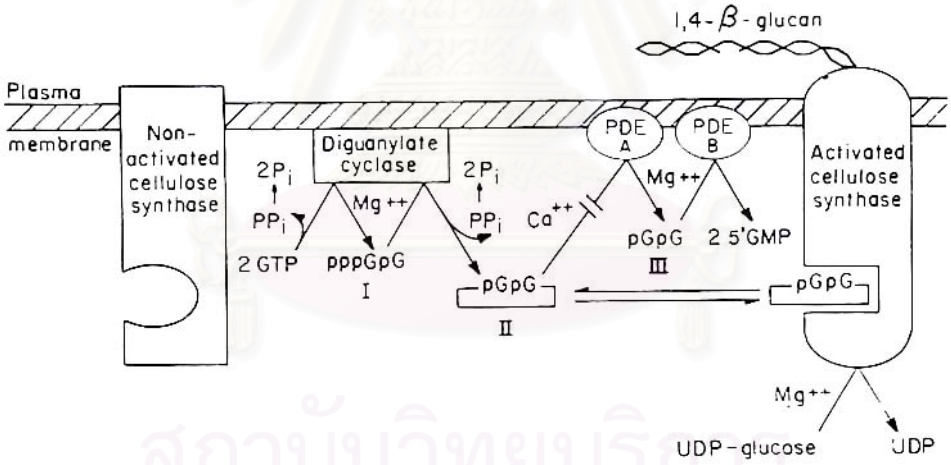
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$\text{UDP-Glc} + (\beta\text{-1,4-glucose})_n \text{ ----------> } \text{UDP} + (\beta\text{-1,4-glucose})_{n+1}$$



รูปที่ 5 วิถีชีวเคมีของการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*

ที่มา : Yoshinaga และคณะ (1997)

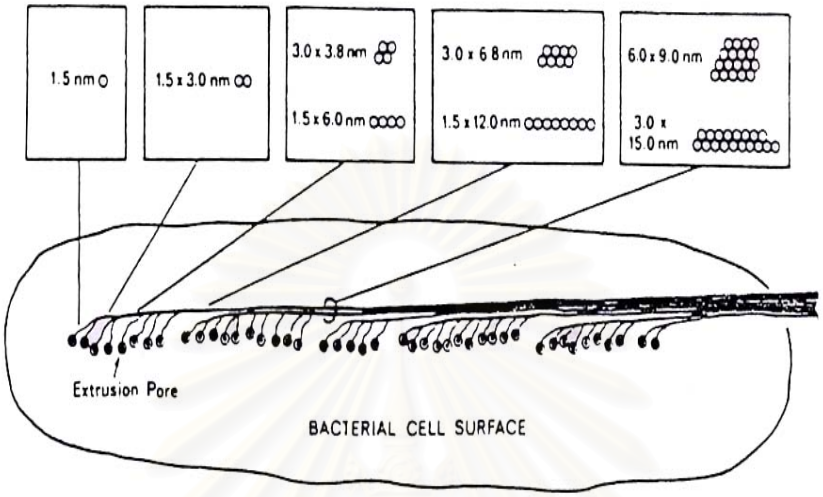


รูปที่ 6 กลไกการสังเคราะห์เซลลูโลสโดย cellulose synthase

ที่มา : Ross และคณะ (1991)

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

microcrystalline ของ microfibril แล้วแต่ละสายของ microfibril จะมัดรวมตัวกันเป็นเกลียว (ribbon) (Ross และคณะ,1991) ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 การรวมตัวของเส้นใยเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum*
ที่มา : Ross และคณะ (1991)

2.4.4 ลักษณะทางกายภาพของเซลลูโลสและโครงสร้างของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่สร้างโดย *Acetobacter xylinum*

จากการศึกษา freeze fracture ภายใต้ผนังเซลล์ด้านนอก (outer membrane) ของ *Acetobacter xylinum* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องทะลุผ่าน (Transmission Electron Microscopeม, TEM) พบแถวของเทอร์มินัลคอมเพล็กซ์ (Terminal complex, TC) ที่เป็นรูเปิดขนาดประมาณ 3.5 นาโนเมตร เรียงขนานไปกับแกนสมมาตรตามยาวของเซลล์ (Brown, Willison และ Richardson, 1976 และ Zaar, 1977) ดังแสดงในรูปที่ 8 ในกระบวนการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* สายตรงของ 1,4- β-glucan จะถูกสังเคราะห์โดย catalytic site ที่อยู่ในชั้นของไซโตพลาสมิกเมมเบรน (cytoplasmic membrane) จากการศึกษาโดย molecular modeling ต่อมา Brown (1996) เสนอว่าในขั้นแรกนั้นสายของ 1,4- β-glucan จำนวน 4 สาย จะรวมกันเกิดเป็น single mini-sheet โดยอาศัยแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) จากนั้น mini-sheet จำนวน 4 สายที่อยู่ภายใน terminal complex-subunit (TC-subunit) เดียวกันจะรวมกันเป็นสายของ mini-crystal หรือ sub-elemental fibril โดยสายของ

sub-elemental fibril ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.5 นาโนเมตร จะถูกขับออกมาจากรูปของ TC-subunit ใน *Acetobacter xylinum* นั้น TC จะมีลักษณะการเรียงเป็นเส้นตรง โดยแต่ละ TC จะประกอบด้วย 3 TC-subunit ที่เรียงอยู่ชิดกัน สายของ sub-elemental fibril 3 สายจะรวมกันในลักษณะของเกลียวนซ้าย (Ruben และ Bokelman, 1987) เกิดเป็นสายของ crystalline microfibril ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 นาโนเมตร จากนั้น สายของไมโครไฟบริล 50-100 สายจะรวมกันเกิดเป็นสายของเส้นใยเซลลูโลสที่มีรูปร่างเหมือนริบบิ้น (ribbon-shaped fibril)ที่มีความกว้างประมาณ 60-80 นาโนเมตร และมีความหนาประมาณ 3-4 นาโนเมตร (Brown และคณะ,1976 ; Zaar, 1977 และ Yoshinaga และคณะ, 1997)

รูปที่ 8 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทะลุผ่านของ P-fracture force ของ lipopolysaccharide membrane (PF) และ outer surface (ES) ของเซลล์แบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* แสดงลักษณะการเรียงเป็นเส้นตรงของ TC ขนานไปกับแกนสมมาตรตามยาวของเซลล์

ที่มา : Zaar และคณะ (1977)

Okiyama, Motoki และ Yamanaka(1992) ศึกษาปริมาณน้ำในแผ่นวุ้นโดย broadline Pulsed NMR พบว่าแผ่นวุ้นเซลลูโลสประกอบด้วยเซลลูโลส 0.9% ในขณะที่มีองค์ประกอบเป็นน้ำอยู่ถึง 99.1% โดยน้ำที่อยู่ในแผ่นวุ้นแบ่งออกเป็น bound water 0.3% และ free water 98.8% นอกจากนี้เมื่อทำการวัดค่า % syneresis ซึ่งแสดงปริมาณน้ำที่เจลสูญเสียออกมาจากโครงสร้าง หลังจากการเซนตริฟิวส์ พบว่า แผ่นวุ้นเซลลูโลสมีค่าของ % syneresis สูงกว่าเจลของ agar และ gelatin ถึง 27 และ 90 เท่า ตามลำดับ ค่าของ free water และ % syneresis ที่สูงมากบ่งบอกว่า

น้ำที่อยู่ในแผ่นวุ้นเซลลูโลส เพียงแต่ถูกกักเก็บไว้ในโครงสร้างที่เป็นรูโพรงขนาดเล็ก โดย capillary action และสามารถสูญเสียออกมาได้ง่าย

2.5 ชนิดของเซลลูโลสที่เชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียสร้างขึ้น

2.5.1 เซลลูโลสชนิดแข็ง (Hard cellulose)

สร้างโดย *Gluconoacetobacter xylinus (Acetobacter xylinum)* จากซับสเตรทพวกเฮกโซส (Hexose) คือ กลูโคส (Glucose) ฟรุกโตส (Fructose) และ กาแลกโตส (Galactose) พบว่าการเติมเอทานอลเล็กน้อยจะช่วยในการสร้างเซลลูโลสได้ดีขึ้น คำว่า Nata de coco ที่ใช้เรียกชื่อวุ้นน้ำมะพร้าวนั้น เป็นคำในภาษาสเปน หมายถึง แผ่นเซลลูโลสหนาสีขาว หรือสีครีมมาจากมะพร้าวเมื่อวิเคราะห์หาความชื้นของชั้นเซลลูโลสที่ผลิตได้พบว่ามีน้ำเป็นส่วนประกอบประมาณ 95% ส่วนที่เหลือเป็นเซลลูโลส (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 2526)

2.5.2 เซลลูโลสชนิดอ่อน (Soft cellulose)

เซลลูโลสชนิดนี้ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 600 หน่วย ซึ่งเชื่อมกันด้วย β-glycosidic linkage ลักษณะคล้ายกับเซลลูโลสในฝ้ายโดยเชื้อจะใช้แหล่งคาร์บอนจาก เอธิลลีนไกลคอน (Ethylene glycol) กลีเซอรอล(Glycerol) แมนนิทอล (Mannitol) อะราบิโนส(Arabinose) ไซโลส (Xylose) ฟรุคโตส (Fructose) การแลคโตส (Galactose) ซูโครส (Sucrose) แลคโตส (Lactose) ในการสร้างเซลลูโลส (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 2526)

2.6 การนำเซลลูโลสจาก *A. xylinum* ไปใช้ประโยชน์

ได้มีการนำเซลลูโลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อาจจำแนกได้ดังนี้

2.6.1 การนำเซลลูโลสจาก *A. xylinum* ไปผสมกับโพลิเมอร์อื่นๆ เช่น polyvinyl alcohol เพื่อผลิตวัสดุที่มีความแข็งแรง และทนทาน ใช้เป็นสารให้ความหนืด และความคงตัวในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ในการนำเซลลูโลสมาทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อให้ได้ cellulose derivatives เช่น hydroxylmethlycelluose , carboxylmethylcellulose และ cellulose acetate จะทำให้การใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* ได้กว้างขวางขึ้น (White และ Brown,1989 ; Ross และคณะ, 1991 ; Lucca และ Tepper,1994 และ Coffey และ Bell ,1995)

2.6.2 ฟีนอลเรซิน (phenol resin) หรือเส้นใยคาร์บอน (carbon fiber) ซึ่งปกติไม่สามารถทำเป็นแผ่นได้ แต่เมื่อนำเซลลูโลสจาก *A. xylinum* ที่ผ่านการอบแห้งและบดเป็นผงแล้วมาผสมเพื่อเป็นตัวเชื่อม (binder) จะทำให้เส้นใยเหล่านี้ขึ้นรูปเป็นแผ่นได้ (Ross และคณะ,1991)

2.6.3 ในการผลิตกระดาษแอคติเวทเตทคาร์บอน (activated carbon fiber sheets) เพื่อใช้ในการดูดซับสารพิษ การเติมเซลลูโลสจาก *A. xylinum* ลงไปช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษให้ดีขึ้น (Ross และคณะ, 1991)

2.6.4 ในทางการแพทย์ นำไปใช้ในการผลิตผิวหนังเทียม (artificial skin) หลอดเลือดเทียม (artificial arteries) (Ross และคณะ,1991 และ Brown, 2002) และ dialysis membrane (Shibazaki และคณะ, 1993) เป็นต้น

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*

มีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* (สมคิด ธรรมรัตน์, 2530 ; วราวุฒิ ครูส่ง, 2539 ; Alaban, 1962 และ โชคชัยและเกรียงไกร, 2538) ได้แก่

2.7.1 สายพันธุ์ของ *Acetobacter xylinum* และคุณภาพของหัวเชื้อที่ใช้ในการหมัก

Acetobacter xylinum เป็นแบคทีเรียในสกุล *Acetobacter* ซึ่งมีความสามารถในการสร้างกรดอะซีติกหรือกรดน้ำส้มสายชูได้ดี ดังนั้นในการเลือกสายพันธุ์ของ *Acetobacter* sp *xylinum* เพื่อนำมาผลิตเซลลูโลสจะต้องเลือกใช้หัวเชื้อสายพันธุ์ดี ซึ่งมีหลักเกณฑ์ดังนี้ เป็นหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสได้ในปริมาณที่สูง ในระยะเวลาอันสั้น สร้างกรดอินทรีย์เช่น กรดอะซีติก กรดกลูโคนิกในปริมาณต่ำ นอกจากนี้เชื้อที่ใช้ควรจะมีความเสถียรหรือให้ผลผลิตในปริมาณสูงอย่างสม่ำเสมอ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด โดยเฉพาะสามารถใช้น้ำตาลซูโครสซึ่งราคาถูกได้ ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมได้ดี (Asai ,1968)

Toyosaki และคณะ (1995) คัดแยก *Acetobacter* sp. ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสในสภาวะเขย่า จากผลไม้ ดอกไม้ และจากดิน พบว่า *Acetobacter* sp. BPR 2001ที่คัดแยกได้จากผลไม้มีความสามารถในการผลิตเซลลูโลสได้ดีที่สุด

Dudman (1960) ศึกษาการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter acetigenum* 2 สายพันธุ์ *A. xylinum* 6 สายพันธุ์ *A. kutzingianum* 2 สายพันธุ์ และ *A. pasteurianum* 1 สายพันธุ์ พบว่า *A. xylinum* supsp. HCCB-155 เหมาะสมสำหรับนำไปผลิตเซลลูโลส เนื่องจากมีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลสได้สูง

2.7.2 ปริมาณหัวชื้อตั้งต้น

การผลิตเซลลูโลสจากเชื้อแบคทีเรียให้ได้ผลดีนั้นนอกจากเชื้อที่ใช้ต้องบริสุทธิ์แล้ว ปริมาณเชื้อที่ใช้ต้องมีมากพอ เพื่อให้เชื้อเจริญได้อย่างรวดเร็วจนมีปริมาณเกินกว่าเชื้ออื่นๆที่อาจติดมากับน้ำมะพร้าว หรือปนเปื้อนในระหว่างการหมัก โดยปริมาณเชื้อที่เหมาะสมที่ใช้ในการหมักอยู่ในช่วงร้อยละ 10-20 (วราวุฒิ ครูส่ง, 2536) และใช้เชื้อที่มีอายุ 3 วัน จะทำให้ผลผลิตดีที่สุด เมื่อเชื้อเจริญและมีปริมาณมากพอจนถึงระดับหนึ่งเชื้อจะสร้างเซลลูโลส ส่วนการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในปริมาณมาก มีผลทำให้การผลิตเซลลูโลสของเชื้อลดลง รายงานว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 10 ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด แต่ถ้าใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นมากกว่านี้ พบว่า จำนวนเซลล์แบคทีเรียจะหนาแน่นมากเกินไป ทำให้เกิดภาวะแข่งขัน จนมีการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสลดลง (Alaban ,1962)

2.7.3 น้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวที่ใช้ควรมาจากมะพร้าวแก่ เนื่องจากเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมที่หาได้ง่ายและมีคุณค่าสูง เหมาะสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย (Alaban,1962) โดยเลือกน้ำมะพร้าวที่สดใหม่ มีไขมันน้อย ไม่มีการปนเปื้อนของน้ำมะพร้าวที่เน่าเสีย ก่อนใช้ต้องนำมาต้มให้เดือดเพื่อให้ไขมันละลาย และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปะปนมา ขณะเดือดควรช้อนเอาฟองและไขมันที่ผิวหน้าทิ้งไป (สมคิด ธรรมรัตน์, 2531) และไม่ควรเจือจางน้ำมะพร้าว เนื่องจากจะทำให้ได้ผลผลิตน้อยลง (Alaban,1962)

2.7.4 สารอาหารคาร์บอน (carbon source)

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *A. xylinum* โดยเป็นแหล่งพลังงานแก่เชื้อและองค์ประกอบหลักของสายเซลลูโลส เชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ฟรุกโตส น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น ซูโครส แลคโตส น้ำตาลเชิงซ้อน เช่น แป้ง แอลกอฮอล์ เช่น เอธานอล และกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก กรดกลูโคนิก (Masaoka และคณะ,1993) แสดงดัง ตารางที่ 1 นอกจากจะใช้แหล่งคาร์บอนดังกล่าวแล้วยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนอื่น ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำกะทิ น้ำหางนม น้ำลิ้นจี่ น้ำสับปะรด และน้ำฝรั่งสด เป็นต้น น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตมากที่สุด เนื่องจากน้ำมะพร้าวเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น มะพร้าวตากแห้ง การผลิตกะทิสำเร็จรูป น้ำมะพร้าวแก่จะมีน้ำตาล ซึ่งส่วนมากเป็นน้ำตาล กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส อยู่ถึง 3% แต่เนื่องจากปริมาณน้ำตาลดังกล่าวในน้ำมะพร้าวไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และความอ่อน-แก่ ของมะพร้าว

ดังนั้นจึงต้องทำการเติมน้ำตาลลงในน้ำมะพร้าว เพื่อให้แน่ใจว่ามีปริมาณคาร์บอนมากพอ สำหรับการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นของเชื้อ (วราวุฒิ ครูส่ง, 2539)

ตารางที่ 1 แหล่งคาร์บอนสำหรับ *A. xylinum*

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

ที่มา : Masaoka และคณะ (1993)

Alaban (1962) ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp. ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ซูโครส กาแลคโตส แมนนิทอล มอลโตส แลคโตส

และอราบิโรส พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และกลีเซอรอลให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ

ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนก็มีผลเช่นกัน Masaoka และคณะ (1993) แปรชนิดของแหล่งคาร์บอนพบว่า กลูโคส ฟรุกโตส และกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม และพบว่า เซลลูโลสจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส Oikawa และคณะ (1995) เลี้ยง *Acetobacter xylinum* KU-1 ในอาหารที่ใช้แมนนิทอลและอาราบิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้แมนนิทอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เชื้อให้ผลผลิตเซลลูโลสมากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 3 เท่า และการใช้อาราบิทอลร้อยละ 1.5 เชื้อให้ผลผลิตเซลลูโลสมากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 6 เท่า

2.7.5 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)

เซลล์แบคทีเรียมีองค์ประกอบของไนโตรเจนประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ความต้องการไนโตรเจนของแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และปัจจัยทางสิ่งแวด-ล้อม เช่น พีเอช อุณหภูมิ และออกซิเจน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไนโตรเจนอยู่เลยจะทำให้ *Acetobacter xylinum* ไม่สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ การเติมสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยเฉพาะสารที่อยู่ในรูปของแอมโมเนีย จะช่วยเร่งการเจริญเติบโตและการสร้างเซลลูโลสให้เร็วขึ้น (White, 1995) ตามธรรมชาติแล้ว น้ำมะพร้าวมีสารประกอบไนโตรเจนในรูปของโปรตีนอยู่ประมาณ 0.4% (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ, 2535) ซึ่งจะช่วยให้ *Acetobacter xylinum* เจริญและสร้างแผ่นวุ้นได้ แม้จะไม่เติมไนโตรเจนเพิ่มลงไป อย่างไรก็ตาม การเติมสารประกอบไนโตรเจนเพิ่มเติม จะช่วยเร่งให้เชื้อผลิตแผ่นวุ้นได้หนาในเวลาสั้น และช่วยให้เชื้อเจริญได้ดี จากการศึกษาพบว่า การใช้แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$) ร้อยละ 0.5 เชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไนโตรเจนจากแหล่งอื่นๆ ได้แก่ $(NH_4)_2SO_4$, KNO_3, $NaNO_3$, peptone, yeast extract และ corn steep liquor เป็นต้น

2.7.6 สารประกอบแมกนีเซียม

แมกนีเซียมไอออน (Mg2+) สามารถกระตุ้นให้ *Acetobacter xylinum* ผลิตแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ดีขึ้น โดยชนิดและปริมาณของสารประกอบแมกนีเซียมที่เหมาะสม คือ แมกนีเซียมซัลเฟต ($Mg_2SO_4.7H2O$) ที่ความเข้มข้น 0.05% (สมคิด ธรรมรัตน์, สมศรี ลิมปิพัฒนวิทย์, 2531 และ Alban, 1962)

2.7.7 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิสมของแบคทีเรีย แม้ว่า *Acetobacter xylinum* สามารถเจริญได้ในช่วง pH 3.5-7.5 แต่ pH ที่เหมาะสมต่อการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลส จะอยู่ในช่วง 4.5-6.0 (Alban, 1962 และ Masaoka และคณะ,1993) นอกจากนี้การปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยการใช้กรด เช่นกรดอะซีติกยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จากการรายงานของ Alban(1962) พบว่าการเติมกรดอะซีติก 1% ช่วยป้องกันการปนเปื้อนจาก *Aspergillus* sp. ได้ และเมื่อเพิ่มปริมาณเป็น 2% จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนจาก *Pennicillium* sp. และ *Bacillus* sp. ได้ ในระหว่างการหมักนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ใช้เลี้ยงจะลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากกรดกลูโคนิกที่เชื้อสร้างขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้นเชื้อจะผลิตกรดกลูโคนิกมากขึ้น และส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลงมาก แม้ว่าการเติมกรดกลูโคนิกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ แต่การที่เชื้อเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิกจะทำให้มีสารตั้งต้นสำหรับการสร้างเซลลูโลสน้อยลง (Masuoka และคณะ,1993)

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

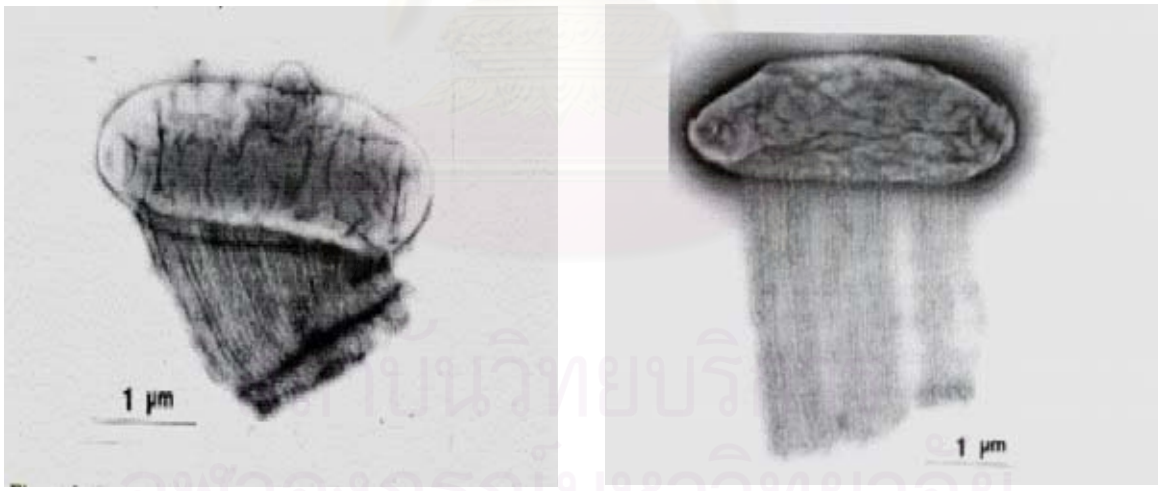
Alaban (1962) รายงานว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ 4-5 เป็นสภาวะที่เหมาะ-สมต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *A. xylinum* เมื่ออาหารมีค่าพีเอช 3 การเจริญของเชื้อจะลดลง และค่าพีเอชมากกว่า 8 เชื้อไม่สามารถเจริญได้

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

2.7.8 อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก

A.xylinum สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 28-32 องศาเซลเซียส เนื่องจากการสร้างแผ่นวุ้นสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเชื้อเป็นอย่างมาก ดังนั้นการสร้างแผ่นวุ้นจะเกิดได้เร็วเมื่อเชื้อเจริญได้ดี ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้มากๆ เชื้ออาจเจริญได้ แต่ไม่สร้างเซลลูโลส เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อสมบัติของเอนไซม์และการเสียสภาพของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิสมของเชื้อ

Alaban (1962) และ Lapuz และคณะ (1967) รายงานสอดคล้องกันว่าในการเลี้ยง *Acetobacter* sp. ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิในช่วง 10-45 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศา-เซลเซียส เชื้อเจริญเติบโตได้ แต่ไม่สร้างเซลลูโลส การสร้างเซลลูโลสเชื้อจะเริ่มสร้างที่อุณหภูมิเท่ากับ 20 องศาเซลเซียส นอกจากนี้อุณหภูมิยังส่งผลต่อพฤติกรรมการสร้างเส้นใยเซลลูโลสของเชื้อโดย Hirai และ Horii (1999) ศึกษาพบว่าการเลี้ยง *A. xylinum* ในอาหาร Hestrin & Schramm ที่ 4 องศาเซลเซียส เชื้อไม่สามารถสร้างเส้นใยเซลลูโลสเป็นเกลียว (ribbon) แต่จะสร้างเส้นใยเซลลูโลสที่มีลักษณะ Dense และ Coarse (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 ลักษณะการพันของเส้นใยเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*

A : แบบ Dense B : แบบ Coarse

ที่มา : Hirai และ Horii (1999)

2.7.9 ออกซิเจน

เนื่องจาก *Acetobacter xylinum* ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ดังนั้นการหมักเพื่อให้เชื้อเจริญ และสร้างแผ่นวุ้นได้ดีจึงต้องหมักในภาชนะที่มีผิวหน้ากว้าง เพื่อให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสของอากาศกับอาหารเลี้ยงเชื้อมากๆ นอกจากนี้ควรใช้วัสดุที่มีการระบายอากาศได้ดี เช่น กระดาษหนังสือพิมพ์ หรือ ผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้วปิดปากภาชนะ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนในระหว่างการหมัก (สมคิด ธรรมรัตน์, 2531)

2.7.10 สารส่งเสริมการสร้างเซลลูโลส

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

ในขณะที่ Tonouchi และคณะ (1998) รายงานว่าการใช้ endoglucanse ทั้งในรูป Meicelase P-1 เป็นเอ็นไซม์ผสมระหว่าง endoglucanse exocellobioglucosidase และ β-glucosidase และ endoglucanse บริสุทธิ์ที่สกัดได้จาก *Bacillus* sp. ความเข้มข้น 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ *Acetobater xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR2001 ผลิตเซลลูโลสได้สูงสุด และ Tonouchi และคณะ, 1998 รายงานว่าการนำยีนที่สังเคราะห์ sucrose phosphorylase (SPase) เป็นเอ็นไซม์ที่สามารถคะตะไลส์ น้ำตาลซูโครส ไปเป็น glucose-1-phosphate และ ฟรุกโตส ที่ได้จาก *Leuconostoc mesenteroids* มาใส่ใน *Acetobacter* strain G7 จะทำให้เชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้นจาก 5.06 เป็น 6.44 กรัมต่อลิตร

2.8 การหมักเพื่อผลิตเซลลูโลสด้วย *Acetobacter xylinum*

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

2.8.1 การหมักแบบสภาวะนิ่ง (static culture)

กระบวนการผลิตโดยทั่วไปใช้น้ำมะพร้าว ซึ่งเป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้คือ มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยใช้น้ำตาลซูโครส 5-10 เปอร์เซ็นต์ ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 4-5 ธาตุอาหารอื่นๆที่เติม เช่น ไดแอมโมเนียมฟอตเฟสหรือแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปต้มฆ่าเชื้อ เมื่ออาหารเย็นถ่ายลงถาดหรือภาชนะที่มีขอบ

สูง คลุมด้วยผ้าขาวบาง ห้องบ่มต้องมีการสุขาภิบาลที่ดี ฆ่าเชื้อห้องบ่มก่อนการหมักทุกครั้ง จากนั้นใส่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10-40 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-14 วัน (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ, 2535) จนได้แผ่นเซลลูโลสบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขาวครีมมีเนื้อสัมผัสเหนียวแน่น กระบวนการผลิตดังกล่าวเรียกว่า การหมักแบบสภาวะนิ่ง (static culture) ใช้เวลาในการผลิตนาน มีของเหลือทิ้งจากการหมักสูง ใช้พื้นที่มากและควบคุมสภาพปลอดเชื้อได้ยาก

Dudman (1960) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* สายพันธุ์ต่างๆในสภาวะผิวนิ่งกับสภาวะเขย่า พบว่าการผลิตเซลลูโลสในสภาวะผิวนิ่ง มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ และผลผลิตเซลลูโลส (cellulose yield) เกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำกว่าการผลิตในสภาวะเขย่าเนื่องจากระยะเวลาในการผลิตนานกว่า แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศโดยการเขย่า พบว่า ผล-ผลิตเซลลูโลสลดลง ซึ่งทำการแก้ไขโดยการเติม neutralizing agent และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตเซลลูโลสของการหมักทั้งสองแบบ พบว่าการหมักในถังหมักได้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

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

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

2.8.2 การหมักแบบสภาวะเขย่า และแบบมีการให้อากาศโดยใช้เครื่องหมัก

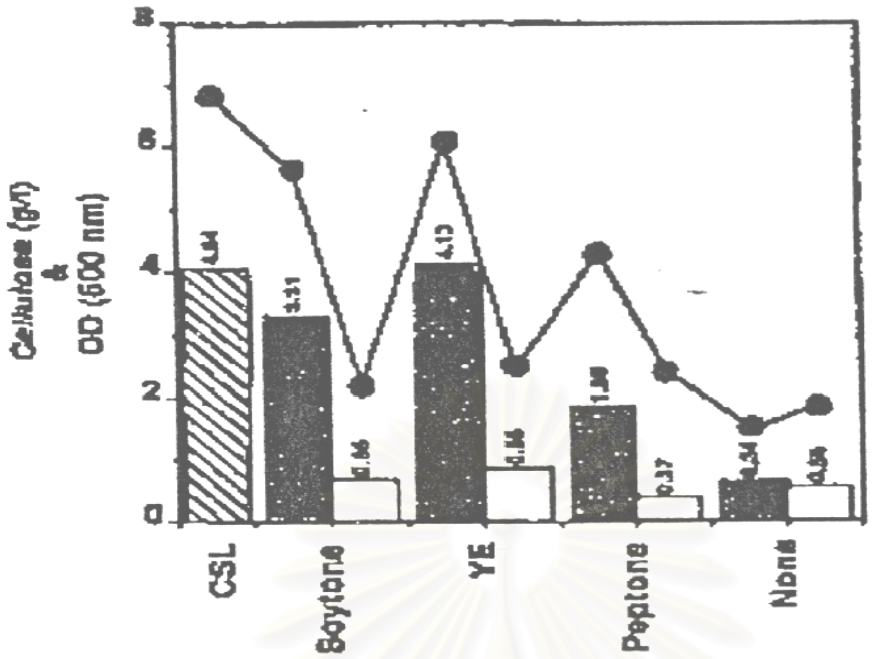
Kouda และคณะ (1997) ศึกษาผลของความดันของก๊าซออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของ*A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR3001A ในถังหมัก พบว่า อัตราการผลิตเซลลูโลสจะขึ้นอยู่กับอัตราการส่งผ่านออกซิเจน เมื่อการผลิตเซลลูโลสของเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ การส่งผ่านออกซิเจนของการหมักจะลดลง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

Chao และคณะ (2000) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสใน 50 L Internal -loop airlift reactor โดยใช้ *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR2001 พบว่า อัตราการผลิตเซลลูโลสในถังหมักแบบ airlift มีค่าเท่ากับ 0.0567 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าการผลิตเซลลูโลสโดยใช้ agitated-stirred tank fermenter และเมื่อมีการเติมออกซิเจนในอากาศที่ให้แก่ถังหมัก 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอากาศที่ให้แก่ระบบ พบว่า อัตราการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า แต่ลักษณะเซลลูโลสที่ได้แตกต่างจาก fibrous form คือ มีลักษณะเป็น pellet ซึ่งให้ลักษณะการถ่ายโอนออกซิเจนที่ดีกว่า

2.9 อิทธิพลของแลคเตทต่อการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*

Masuoka และคณะ (1996) ได้ศึกษาอิทธิพลของสารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจน คือ corn steep liquor (CSL), soytone, yeast extract และ peptone พบว่า CSL เหมาะสมที่สุดในการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* supsp. *Sucrofermentan* BPR 2001 โดยพบว่า CSL เท่านั้นที่มีแลคเตทเป็นองค์ประกอบอยู่ จึงเติมแลคเตทลงไปในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ผลปรากฏว่าการผลิตเซลลูโลสสูงขึ้นจนใกล้เคียงกับการเลี้ยงในอาหาร CSL ดังรูปที่ 10 นอกจากนี้ยังทดลองใช้ แลคเตทในปริมาณ 0.15 %(v/v) ร่วมกับอาหาร basal medium ในการเลี้ยง *A.xylinum* subsp.*sucrofermentans* BPR 2001 ผลการทดลองพบว่าเชื้อผลิตเซลลูโลสได้เพิ่มขึ้น 4.57 เท่า เนื่องจากแลคเตทเข้าไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลลูโลสในช่วงเริ่มต้นและทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับห่วงโซ่การหายใจและการผลิตพลังงานเพื่อการเจริญเติบโต ดังนั้นแลคเตทจึงทำหน้าที่เสมือนตัวเร่งการขับเคลื่อน TCA Cycle เหมือนกับตัวสร้างพลังงานซึ่งดูได้จากผลการสร้างเซลลูโลสที่สูงขึ้นและเซลล์เจริญได้อย่างรวดเร็วนั่นเอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 การผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* supsp. *Sucrofermentan* BPR 2001 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน ,แท่งสีดำ: มีแลคเตท, แท่งสีขาว : ไม่มีแลคเตท ; เส้นคือ การเจริญของเชื้อ

ที่มา : Matsuoka และคณะ (1996)

2.10 อิทธิพลของเมไธโอนีน ต่อการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*

เมไธโอนีน เป็นกรดอะมิโน จึงจัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรียประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของเชื้อแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน และความต้องการยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นอีกเช่น พีเอช ออกซิเจน และ อุณหภูมิ เป็นต้น ตามธรรมชาติแล้วน้ำมะพร้าวมีสารประกอบไนโตรเจนอยู่ร้อยละ 0.4 (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ ,2539) *Acetobacter xylinum* สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ แต่อย่างไรก็ตามการเติมสารประกอบไนโตรเจนจะช่วยเร่งการเจริญและการสร้างเซลลูโลส โดยสารประกอบไนโตรเจนเกี่ยวข้องกับ nitrogenous regular gene บน cellulose synthase ได้แก่ acsAB, acsC และ acsD และปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่เติมลงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวจะต้องส่งเสริมการใช้น้ำตาลของเชื้อเพื่อการสร้างสารเมตาบอไลท์ต่างๆ โดยเฉพาะเซลลูโลส

Matsuoka และคณะ(1996) ซึ่งได้ศึกษาผลของกรดอะมิโนต่อการผลิตเซลลูโลส โดยการเปรียบเทียบกับ CSL ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดเพราะพบว่า มีกรดอะมิโนหลายชนิดเป็นองค์ประกอบโดยใช้อาหารที่เติมเมไธโอนีนเพียงอย่างเดียว อาหารที่เติมกรดอะมิโน 14 ชนิด อาหารที่เติมกรดอะมิโน 14 ชนิดยกเว้นเมไธโอนีนและอาหารที่ไม่เติมกรดอะมิโนเลย พบว่า ใน

อาหารที่มีเมไธโอนีนเพียงอย่างเดียว มีปริมาณเซลลูโลสใกล้เคียงกับอาหารที่มีกรดอะมิโนทั้ง 14 ชนิด และในอาหารที่ไม่มีเมไธโอนีนจะมีปริมาณเซลลูโลสที่ต่ำมาก นอกจากนี้ Matsuoka และคณะ(1996) ยังได้ทดลองแปรปริมาณเมไธโอนีน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4 ระดับคือ 0 0.0025 0.005 และ 0.0075% (w/v) และพบว่าปริมาณเมไธโอนีนที่ใช้ คือ 0.005% (w/v) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลการเจริญของเชื้อและการผลิตเซลลูโลสดีที่สุด

2.11 ลักษณะและความสำคัญของชา

2.11.1 ความสัมพันธ์ระหว่างชากับ *Acetobacter xylinum*

Tea fungus หรือ kombucha tea รู้จักกันดีในชื่อ Manchurin หรือ kargasok mushroom ไม่ใช่เห็ด kombucha tea จะถูกสร้างในโครงสร้างของเยื่อบุผิวและเป็นการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิตคือแบคทีเรีย และยีสต์ ต่างๆ ในส่วนของแบคทีเรียได้แก่ *Acetobacter xylinum, Acetobacter ketogenum, Pichia fermentans* และยีสต์หลายๆชนิด ซึ่งโดยปกติยีสต์ที่พบคือ *Saccharomyces, Brettanomyces* และ *Zygosaccharomyces* (Sadjadi,1998)

kombucha tea จำเป็นต้องดำรงชีวิตในสารละลายของชาดำและน้ำตาล ในอุณหภูมิที่เหมาะสม เชื้อจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ไม่สร้างสปอร์เช่นเดียวกับยีสต์โดยปกติ แต่ใช้การเพิ่มจำนวนโดยกระบวนการผลิต glucuronic acid lactic acid acetic acid และ vitanmin ต่างๆแทน เชื้อยีสต์จะเปลี่ยนรูปน้ำตาลและชาดำเป็นเอ็นไซม์ kombucha tea มีคุณลักษณะเป็นสารปฏิชีวนะ(Mayser และคณะ,1995)

Brown และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสของ*Acetobacter xylinum* พบว่าเชื้อจะสร้างเส้นใยได้ดี ถ้าเลี้ยงในสภาวะที่มีอาหารเหมาะสม และได้เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี kombucha tea รวมทั้งศึกษา polyphenolic component ใน kombucha tea พบว่า kombucha tea มีองค์ประกอบสิ่งมีชีวิตที่อยู่ร่วมกันระหว่าง แบคทีเรียและยีสต์ สารอาหารจากชาสามารถทำให้เชื้อสร้างเซลลูโลสได้

Mayser และคณะ (1995) ศึกษาผลของ kombucha tea พบว่ายีสต์ที่เป็นองค์ประกอบในโคโลนีมีความหลากหลายมากแต่สายพันธุ์ที่ใช้มากและบ่อยที่สุดคือ *Saccharomyces, Brettanomyces* และ *Zygosaccharomyces* kombucha tea นั้น สามารถเตรียมได้ง่าย ในการทดลองแปรปริมาณชาที่ใช้ เป็น 10 20 30 และ 40% dry tea พบว่า ชาแห้งที่

ใช้เริ่มต้น 20% dry tea เชื้อสามารถเจริญได้ดีที่สุด ค่าความเป็นกรดของ product อยู่ที่ประมาณ 33 กรัมต่อลิตร ของกรดทั้งหมด มีความสัมพันธ์กับการจำกัดความสามารถของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตาม ถ้ากระบวนการหมักทำอย่างต่อเนื่องและยาวนาน ปริมาณค่าความเป็นกรดก็จะเพิ่มระดับสูงขึ้น เกิดความเสี่ยงหากนำไปใช้ในการบริโภค Lavine และ Feller (1940) รายงานผลของกรดอะซิติกที่เกิดจากกระบวนการหมักว่าสามารถยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ได้ เมื่อใช้ในปริมาณที่พอเหมาะ อย่างไรก็ตาม ถ้าใช้ในปริมาณน้อยคือ 1 กรัมต่อลิตร(0.1%) ของกรดอะซิติกจะสามารถยับยั้งเชื้อที่ทำให้เกิดโรคและการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียได้

Hesseltine (1965) รายงานผลของการหมักชาและตัวอย่างที่มีความเป็นกลางค่อนข้างสูงต่อการยับยั้งเชื้อ *Agrobacterium tumerfacien* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคพื้นฐานในพืช แต่ยังไม่ได้รายงานผลของสับสเตรทที่ใช้ในการหมัก ดังนั้น จึงไม่ทราบว่าสภาวะการต้านและการยับยั้งเชื้อนั้นเป็นผลมาจากส่วนประกอบของชาที่ทำให้สภาวะเป็นกลางเพื่อต่อต้านจุลชีพหรือไม่

Toda และคณะ (1991) พิสูจน์ว่าใน kombucha tea ที่มีเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆอยู่ร่วมกันและมีความเข้มข้น 20% (dry tea) จะสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคประเภท *Stapphylococcus aureus*, *Stapphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri* และ *Vibrio* spp. ได้ดี และสามารถใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้

Lapuz และคณะ(1967) และ Dolendo และ Maniquis (1967)สรุปว่าร่างแหเซลลูโลสที่ลอยอยู่บนผิวหน้าของน้ำผลไม้ คือ น้ำมะพร้าว และ สับปะรด ซึ่งหมักโดย เชื้อที่อยู่ร่วมกันระหว่าง *Acetobacter xylinum* และยีสต์ ให้ชื่อว่า "Nata" ซึ่งใช้บริโภคกันในประเทศฟิลิปปินส์ ส่วนในประเทศบราซิล ใช้เซลลูโลสที่ได้จาก *Acetobacter xylinum* และยีสต์ นี้สำหรับการควบคุมอันตรายจากการเผาไหม้บริเวณผิวหนัง ซึ่งเชื้อ *Acetobacter xylinum* และยีสต์นี้จะเจริญได้ดีในชาที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส tea xanthines เอธานอล organic acids และ usnic acids (Fontana และคณะ, 1991)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.11.2 สารที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในชา

สาระสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในชา ได้แก่ Polyphenols, flavonoids Catchin, epicatechin, epicatechin gallate, proanthocyanidin (ตารางที่ 2 และ 3)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของสารต่างๆในใบชาสด (Chemical composition of a fresh tea leaf)

Compounds		(% dry wt.)	
polyphenols	36	carbohydrate	25
Methylxanthines	3.5	Protein	15
Amino acid	4	Lignin	6.5
Organic acid	1.5	Lipids	2
Carotenoids	<0.1	Minerals	5
Volatiles	<0.1	Chlorophyll,etc.	0.5

ที่มา : www. herb108.com/nuke/modules

สารคาเฟอีน (caffeine) สารตัวนี้เป็นที่ถกเถียงกันในวงการแพทย์ว่ามีประโยชน์ หรือโทษกันแน่ แต่โดยทั่วไปยอมรับกันว่าถ้าดื่มไม่เกินวันละ 200 มิลลิกรัม ก็ไม่มีผลเสียอะไร ซึ่งในปริมาณนี้จะเท่ากับการดื่มกาแฟประมาณวันละ 2 ถ้วย (ถ้วยละประมาณ 8 ออนซ์) เท่ากับชาวันละประมาณ 5 ถ้วย (ใบชาจะมีคาเฟอีนประมาณ 30-40% ของกาแฟ) (Steiger และ Steinegger, 1957)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สำคัญคือ กลุ่มโพลีฟีนอลส์ (polyphenols) ที่เด่นๆ คือ epigallocatechin-3-gallate (EGCG หรือ catechins) ประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระนั้นมีมากมายตั้งแต่การป้องกันการเกิดโรคต่างๆ จนถึงมะเร็ง (Steiger และ Steinegger, 1957)

สารแทนนิน (tannin) ซึ่งช่วยในการบรรเทาอาการท้องเสีย หากมีการต้มชาหรือแช่ชานานๆ จะทำให้ได้ปริมาณสารแทนนินจำนวนมาก (Steiger and Steinegger, 1957)

แร่ธาตุอื่นๆ เช่น ฟลูออไรด์ วิตามินเอ วิตามินบี 1 บี 2 และอื่นๆ อีกหลายชนิด ในชานั้นมีกรดอะมิโนมากกว่า ๒๐ ชนิด ที่เด่นคือ Thiamine มีถึง 38-54 % มีคาเฟอีนเฉลี่ย 3 % และสารแอลคาลอยด์อีกคือ Thesphyllin, Theobromine และยังมี อลูมิเนียม (Al), แมงกานีส(Mn) และ

ยังมี โปแตสเซียม (K) มากที่สุด ชาดำ 1 g ให้ โปแตสเซียม (K) มากกว่า 10 mg ถัดมาเป็น ฟอสฟอรัส (P) และแมกนีเซียม(Mg) แต่จากการวิจัยบอกแล้วว่าไม่มีพิษ ชาบางแห่งมีธาตุ F (Fluoride) ติดมาด้วย นอกจากนี้ก็ยังมีการใส่ชาลงในเครื่องสำอางต่างๆ เช่น สบู่, แชมพู, ครีมบำรุงผม นั้นยังไม่มีการทดสอบที่ดีพอทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ในคนที่จะบอกว่าได้ผลจริง (Jean Carper, 1995)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของสารต่างๆในยอดใบชาสด(Chemical composition of a fresh tea shoot)

Compounds	(% dry wt.)
Total polyphenols	25-30
Flavanols	
[-] Epigallocatechin gallate	8-12
[-] Epicatechin gallate	3-6
[-] Epigallocatechin	3-6
[-] Epicatechin	1-3
[-] Catechin	1-2
[-] Gallocatechin	3-4
Flavonols and Flavonol glycosides	3-4
Leuco anthocyanins	2-3
Polyphenolic acid and depsides	3-4
Caffeine	3-4
Theobromine	0.2
Theophylline	0.5
Amino acid	4-5
Organic acid	0.5-0.6
Monosaccharides	4-5
Polysaccharides	14-22
Cellulose and Hemicellulose	4-7
Pectins	5-6
Lignin	5-6
Chlorophylls and other pigments	0.5-0.6
Ash(minerals)	5-6
Volatiles	0.01-0.02

ที่มา : www.cpcrop.com/tea/tea02_var.htm

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย

3.1.1.1 Hand refractometer

3.1.1.2 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) SCHOTT model CG 840

3.1.1.3 เครื่องชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง Sartorious

3.1.1.4 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) LAB-LINE Instrument, Inc.

3.1.1.5 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) TOMY model SS-320 และ SANYO Labo

3.1.1.6 ตู้อบลมร้อน (อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส) WTB binder

3.1.1.7 ตู้อบลมร้อน (อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส) PROLABO

3.1.1.8 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) United Instrument Co.,LTD.และ Haraeus Instruments

3.1.1.9 ตู้เขี่ยเชื้อ (Larminar flow carbinet) ISSCO model BVT-123

3.1.1.10 เครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) Hettich model EBA 12

3.1.1.11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Milton Roy model Spectronic G01

3.1.1.12 เครื่องแยกเหวี่ยง (Centrifuge) Hettichi model EBA 12

3.1.2 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.2.1 แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Ammonium dihydrogenphosphate) AR Grade

3.1.2.2 แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate) AR Grade

3.1.2.3 กรดอะซิติก (Acetic acid) AR Grade

3.1.2.4 ผงวุ้น (Agar powder) Merck

3.1.2.5 กลูโคส (Glucose) AR Grade

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2.6 ซูโครส (Sucrose) AR Grade

3.1.2.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) AR Grade

3.1.2.8 ฟีนอล (Phenol) AR Grade

3.1.2.9 กรดซัลฟุริก (Sulphuric acid) AR Grade

3.1.2.10 ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolpthalene) AR Grade

3.1.2.11 เอธานอล (Ethanol) AR Grade

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

3.1.2.13 ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) Oxoid, England

3.1.2.14 แคลเซียมคาร์บอเนต(Calcium carbonate)

3.1.2.15 แอล-อะราบิโนส(L- arabinose)

3.1.2.16 ดี-ฟรุคโตส (D - fructose)

3.1.2.17 ดี- กาแลคโตส (D-galactose)

3.1.2.18 กลีเซอรอล (Glycerol)

3.1.2.19 ดี-แมนโนส (D- mannose)

3.1.2.20 ดี-แมนนิทอล (D-mannitol)

3.1.2.21 น้ำตาลซูโครส (sucrose)

3.1.2.22 ดี-ไซโลส (D-xylose)

3.1.2.23 DL- methionine

3.1.2.24 Sodium-DL-lactate

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเซลลูโลสจากผลไม้สุก

3.2.1.1 ทำการเก็บตัวอย่างจากผลไม้สุกงอม 10 ชนิด ได้แก่ แอปเปิ้ล กล้วยหอม น้อยหน่า ฝรั่ง ลางสาด ลำไย สับปะรด เงาะ สตรอเบอรี่ มังคุด จากตลาดสดทั่วไปในกรุงเทพมหานคร ได้แก่ ตลาดสดสามย่าน ตลาดสดพรานนก ตลาดสดคลองเตย และตลาดสดรังสิต วัดปริมาณน้ำตาลของผลไม้แต่ละชนิดในรูปของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid, TSS) ด้วย แฮนด์ รีแฟรกโตมิเตอร์ (Hand refractometer) ในขั้นตอนนี้ จะดำเนินการ 2 วิธี

วิธีแรก แยกเชื้อจากผลไม้โดยตรง โดยใช้ ลูปเขี่ยเชื้อบริเวณส่วนที่มีรอยช้ำหรือเน่าของผลไม้ streak ลงบนอาหารวุ้น GEY ซึ่งเติม $CaCO_3$ (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 2-3

วัน จากนั้นนำมาแยกเชื้อที่สร้างกรดจะสังเกตจากโคโลนีที่มี clear zone รอบๆ นำเชื้อที่แยกได้ไป streak ซ้ำ เพื่อให้แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆอีกครั้ง เก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ไว้ในอาหารแข็ง GYPG ใน slant agar (Asai และคณะ, 1968) (ภาคผนวก ก)เพื่อนำมาศึกษาในด้านอื่นๆต่อไป โดยทำการย้อมแกรมและการทดสอบทางชีวเคมี

วิธีที่ 2 ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Enriched culture) ก่อนโดยเก็บตัวอย่างผลไม้สุกงอมแต่ละชนิดหนักประมาณ 1-2 กรัม จากส่วนที่เป็นรอยช้ำหรือเน่า โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ใส่ลงในหลอดขนาด 30 มล. ซึ่งมีอาหารเหลว GEY (ภาคผนวก ก) หลอดละ 15 มล. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน (Asai และคณะ, 1964) แล้วจึงแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารวุ้น GEY โดยนำของเหลวจากหลอดที่เพิ่มปริมาณเชื้อแล้ว มา streak ลงบนจานอาหารวุ้น GEY ซึ่งเติม $CaCO_3$ (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนำมาแยกเชื้อที่สร้างกรดซึ่งจะสังเกตจากโคโลนีที่มีclear zone รอบๆ นำเชื้อที่แยกได้ไป streak ซ้ำเพื่อให้แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆอีกครั้ง เก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ไว้ในอาหารแข็ง GYPG ใน slant agar (Asai และคณะ, 1968) (ภาคผนวก ก) เพื่อนำไปศึกษาในด้านอื่นๆต่อไป โดยทำการย้อมแกรมและการทดสอบทางชีวเคมี

3.2.1.2 คัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้ โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาบ่มต่อไปบนอาหารเหลว GEY ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 14 วัน ถ้าสังเกตเห็นชั้นของวุ้นหรือเซลลูโลสที่ผิวหน้าอาหาร นำเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ โดย streak บนจานอาหารวุ้นน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก) นำเชื้อที่ได้มาเก็บในหลอดอาหารวุ้น GYPG (ภาคผนวก ก) เพื่อศึกษาต่อไป

3.2.1.3 ศึกษาการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในสภาวะนิ่ง โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหารน้ำมะพร้าวชนิดเหลวปริมาตร 1 ลิตร (อาหารน้ำมะพร้าวประกอบด้วย น้ำมะพร้าวแก่ที่ผ่านการกรองต้มเดือด และแยกไขมันออก 1 ลิตร น้ำตาลทราย 5 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้เท่ากับ 4.75) โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (อังคณา พันธ์ศรี, 2541) เลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งโดยแปรอุณหภูมิเป็น 3 ระดับ คือ 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ

ติดตามผลการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดย

- cell content โดยวิธี viable plate count (ภาคผนวก ข.)
- sugar utilization (Dubois และคณะ, 1956) (ภาคผนวก ข.)
- pH โดยใช้ pH meter (ภาคผนวก ข.)
- Acidity (AOAC, 1990) ทุก 24 ชั่วโมง (ภาคผนวก ข.)
- cellulose production (Watanabe และ Yamanaka,1995) (ภาคผนวก ข.)
- ความหนาวุ้น โดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิบเปอร์วัด

คัดเลือกเชื้อที่เจริญดีและสามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงที่อุณหภูมิสูง 3 ระดับ คือ 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ และทำการ Identified เชื้อที่แยกได้ว่าเป็นเชื้อ *Acetobacter xylinum*หรือไม่

3.2.2 ทำการ Identified เชื้อที่แยกได้

นำเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเซลลูโลส มาศึกษาลักษณะต่างๆดังนี้

3.2.2.1 ลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยา การเจริญและสรีรวิทยา

- ตรวจสอบลักษณะเซลล์และการย้อมติดสีแกรม (ภาคผนวก ง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า และตรวจสอบลักษณะของโคโลนีหลักจากการเลี้ยงบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ (ภาคผนวก ก) และบ่มที่30 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. (ภาคผนวก ง) (Hucker และ Cohn, 1923)

3.2.2.2 ลักษณะทางชีวเคมี

ทดสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการของเชื้อ เปรียบเทียบกับเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR893 โดยทำการทดสอบดังนี้

- ทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test) เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้บนอาหารวุ้น GYPG (ภาคผนวก ก) ที่ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 3% จำนวน 1-2 หยด ลงบนโคโลนีหากเกิดฟองแก๊สแสดงว่าให้ผลเป็นบวก เชื้อนั้นสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ถ้าไม่มีฟองแก๊สแสดงว่าเป็นลบ นั่นก็คือเชื้อนั้นไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Komagata, 1975)

-ทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชันของอะซิเตท (Oxidation of acetate) ไปเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทำการเขี่ยเชื้อลงในอาหารเหลว SBYP แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก) ซึ่งในอาหารจะมีอินดิเคเตอร์คือ โบรโมไทมอลบลู ซึ่งมีช่วงการเปลี่ยนสีอยู่ระหว่างความเป็นกรดเป็นด่าง 6.0-7.6 หากอินดิเคเตอร์เปลี่ยนเป็นสีฟ้า แสดงว่า ให้ผลบวกหรือเบสิค (Basic) แต่ถ้าอินดิเคเตอร์ไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าให้ผลเป็นลบหรือแอซิด (Acid) (Asai และ คณะ, 1964)

-ทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชันของแลคเตท (Oxidation of lactate) ไปเป็นคาร์บอเนต (Carbonate) เชื้อที่ให้ผลเป็นบวกจะเกิดลักษณะขาวขุ่นของแคลเซียมคาร์บอเนตรอบโคโลนี โดยทำการเขี่ยเชื้อลงในอาหารวุ้น CY แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก) แต่ถ้าไม่เปลี่ยนแปลงแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Asai และ คณะ, 1964)

- ทดสอบการสร้างอะซิติล เมทธิล คาร์บินอล (Acetyl methyl carbinol) จากแคลเซียมแลคเตท นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว CY แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก) ผลบวกคือเมื่อทำการทดสอบตามภาคผนวก ก จะให้สีชมพูถึงแดง ถ้าไม่เกิดสีแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Gossele และ คณะ, 1983)

-ทดสอบการใช้กรดกลูตามิค (Glutamic acid) ของเชื้อโดยนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารวุ้น GG แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก) ผลบวกคือ เชื้อสามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้ ถ้าไม่เจริญแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Asai และ คณะ, 1964)

-ทดสอบการเจริญในอาหารวุ้นโฮเยอร์-เฟรเทอร์ (Hoyer-Fratear agar) โดยนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารวุ้น Hoyer-Fratear แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก) ผลบวก คือ เชื้อสามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้ ถ้าไม่เจริญแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Asai และ คณะ,1964)

3.2.2.3 นำเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดมาทำการ identified โดยใช้ผลทดสอบลักษณะทางชีวเคมีข้างต้น เทียบกับเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR893 เมื่อได้เชื้อที่คาดว่าเป็น *Acetobacter xylinum* แล้ว นำไปศึกษายืนยันโดยทดสอบ 16s rDNA Sequence Analysis ด้วยโปรแกรม BLASTSn เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของเชื้อ(%similarity) เทียบกับเชื้อที่เป็น Type strain คือ *Acetobacter* paeus *Acetobacter xylinus* *Acetobacter* sp. ITDI2.1 และ *Gluconoacetobacter* sp. DST GL_01 ในขั้นตอนงานวิจัยนี้ ตรวจสอบเชื้อโดย ศูนย์วิจัยส่วนกลางทางพันธุกรรม KU-Vector มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จากนั้นนำเชื้อที่คัดแยกและ Identified ได้ว่าเป็น *Acetobacter xylinum* ไปทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูงต่อไป

3.2.3 <u>การคัดเลือก *Acetobacter xylinum* ที่ผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูงสุดที่อุณหภูมิสูง</u>

นำเชื้อที่คัดแยกและ Identified ได้แล้วว่าเป็น *Acetobacter xylinum* ในข้อ 3.2.2.3 มาศึกษาการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูง

ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น (starter) นั้นประกอบด้วยอาหารเหลวน้ำมะพร้าวใส่ลงในหลอดทดสอบ 5 มิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อ *Acetobacter xylinum* 1 โคโลนีจากจานอาหารแข็งน้ำมะพร้าวลงในหลอดทดสอบที่เตรียมไว้ บ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อ *Acetobacter xylinum* หลอดทดสอบลงในหลอดทดสอบซึ่งมีอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่ง โดยแปรอุณหภูมิ 3 ระดับคือ 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ โดยน้ำมะพร้าวเริ่มต้นที่นำมาใช้จะต้องปรับค่า TSS ให้เป็น 4°Brix ด้วยเครื่อง แฮนด์รีแฟรกโตมิเตอร์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบชั้นเซลลูโลสที่ผลิตได้ในวันที่ 7 ของการหมัก จาก *Acetobacter xylinum* แต่ละสายพันธุ์ ติดตามผลการทดลองโดยทำการตรวจวัด

- cell content โดยวิธี viable plate count (ภาคผนวก ข.)
- sugar utilization (Dubois และคณะ, 1956) (ภาคผนวก ข.)
- cellulose content (Watanabe และ Yamanaka ,1995) (ภาคผนวก ข.)
- acidity (AOAC,1990) (ภาคผนวก ข.)

- pH โดยใช้ pH meter
- ความหนาวุ้น โดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิบเปอร์

คัดเลือกสายพันธุ์เชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูงที่สุดที่อุณหภูมิสูง 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ เพื่อนำไปศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อสายพันธุ์นั้นๆต่อไป

3.2.4 <u>การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *Acetobacter xylinum* ที่ผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูงที่อุณหภูมิสูงที่คัดแยกได้</u>

3.2.4.1 ศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง

เติมน้ำตาลซูโครสในสูตรอาหารน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก) 0 1 3 และ 5 %(w/v) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารน้ำมะพร้าวอยู่ 100 มิลลิลิตร ในการทดลองครั้งนี้ต้องวัดปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่มีอยู่ในน้ำมะพร้าวก่อน จากนั้นเติมหัวเชื้อ (จากข้อ 3.2.3) ลงไป 10 มิลลิลิตร ศึกษาความสามารถในการสร้างแผ่นวุ้นที่อุณหภูมิ 3 ระดับคือ 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 3 5 และ 7 ติดตามผลการทดลองโดยทำการตรวจวัด

- cell content โดยวิธี viable plate count (ภาคผนวก ข.)
- sugar utilization (Dubois และคณะ, 1956) (ภาคผนวก ข.)
- pH โดยใช้ pH meter (ภาคผนวก ข.)
- cellulose content (Watanabe และ Yamanaka ,1995) (ภาคผนวก ข.)
- acidity (AOAC,1990) (ภาคผนวก ข.)
- ความหนาวุ้น โดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิบเปอร์

เลือกความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* ที่อุณหภูมิสูง 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ

3.2.4.2 ศึกษาปริมาณแลคเตทที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง

เตรียมแลคเตทที่มีความเข้มข้น 35 กรัมต่อลิตร (Takkaaki และคณะ, 1998) เติมลงในอาหารน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก) ที่ระดับต่างๆ เป็น 0 0.10 0.15 และ 0.20 %(v/v) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารน้ำมะพร้าวอยู่ 100 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อ (จากข้อ 3.2.3) ลงไป 10 มิลลิลิตร

ศึกษาความสามารถในการสร้างแผ่นวุ้นที่อุณหภูมิ 3 ระดับคือ 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 3 5 และ 7 ติดตามผลการทดลองโดยทำการตรวจวัด

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

เลือกความเข้มข้นแลคเตทที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* ที่อุณหภูมิสูง 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ

3.2.4.3 ศึกษาปริมาณเมไธโอนีนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง

เติมเมไธโอนีนในสูตรอาหารน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก) ที่ระดับต่างๆ เป็น 0 0.0025 0.005 และ 0.0075 %(w/v) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารน้ำมะพร้าวอยู่ 100 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อ(จากข้อ 3.2.3) ลงไป 10 มิลลิลิตร ศึกษาความสามารถในการสร้างแผ่นวุ้นที่อุณหภูมิ 3 ระดับคือ 37 40 และ 42 °ซ เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 3 5 และ 7 ติดตามผลการทดลองโดยทำการตรวจวัด

- cell content โดยวิธี viable plate count (ภาคผนวก ข.)
- sugar utilization (Dubois และคณะ, 1956) (ภาคผนวก ข.)
- cellulose content (Watanabe และ Yamanaka ,1995) (ภาคผนวก ข.)
- acidity (AOAC,1990) (ภาคผนวก ข)
- pH โดยใช้ pH meter
- ความหนาวุ้น โดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิบเปอร์

เลือกความเข้มข้นเมไธโอนีนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* ที่อุณหภูมิสูง 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ

3.2.4.4 ศึกษาผลของการทำงานร่วมกันของน้ำตาลซูโครส แลคเตทและเมไธโอนีน ในปริมาณเหมาะสม ต่อการเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง

นำปริมาณน้ำตาลซูโครส ปริมาณแลคเตท และเมไธโอนีนที่เหมาะสม ผลที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.4.1 3.2.4.2 และ 3.2.4.3 ข้างต้นมาใส่ร่วมกันในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว วัดปริมาณเซลลูโลสของเชื้อที่สร้างได้ ที่อุณหภูมิสูงเทียบกับในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว

3.2.5 ทดลองเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ในน้ำชา และหา fraction ที่แยกได้จากน้ำชาซึ่งมีผลต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* ที่อุณหภูมิสูง

3.2.5.1 เลี้ยงเชื้อในอาหารน้ำชา เปรียบเทียบกับในอาหารน้ำมะพร้าว โดยปริมาณชาเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อคือ 20 กรัมต่อลิตร (2%) dry tea (Mayser และคณะ,1995) ในการเตรียมอาหารน้ำชาเปรียบเทียบกับน้ำมะพร้าว จะเตรียมโดยใช้ปริมาณชาเริ่มต้นที่ 20 กรัมต่อลิตร ต้มในน้ำเดือดปริมาตร 1 ลิตร กรองเอากากออก เติมน้ำตาลทราย 8 เปอร์เซ็นต์(ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับในอาหารน้ำมะพร้าว) แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้เท่ากับ 4.75 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งโดยแปรอุณหภูมิเป็น 3 ระดับ คือ 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ ทำการทดลองโดยการตรวจวัด

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

เปรียบเทียบผลการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อในอาหารน้ำมะพร้าวและน้ำชา

3.2.5.2 นำน้ำชามาแยกสารตามความแตกต่างของ Molecular weight โดยใช้เทคนิค Gel chromatography (Ansari และ Mage, 1977)

เตรียมน้ำชา (ภาคผนวก ก) เริ่มต้นโดยใช้ชาอูหลง 20 กรัมต่อลิตร(2%) dry tea (ปริมาณเท่ากับที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)) ต้มในน้ำเดือด และกรองเอากากออก จากนั้นนำน้ำชาที่เตรียมได้ มาแยกสารตามความแตกต่างของ Molecular weight โดยใช้เทคนิค Gel chromatography โดยใช้คอลัมน์ Sephacryl S-200 HR ใช้โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 M เป็นตัวชะ ใช้อัตราเร็วของการไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ผ่านสารละลายน้ำชาที่เตรียมไว้ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงไปบนคอลัมน์ปริมาตร 1

มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำหลอดที่ได้มาศึกษาผลต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อที่แยกได้

3.2.5.3 ศึกษาผลของแต่ละ fraction ต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลส โดยนำ fractionที่แยกได้มา ทดสอบโดยใส่ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium (Matsuoka และคณะ,1996)ที่เตรียมให้มีความเข้มข้น 2 เท่า (ภาคผนวก ก) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร คือเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ได้ 2 มิลลิลิตร ก็เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาตร 2 มิลลิลิตรเช่นกัน จากนั้นเติมเชื้อ *Acetobacter xylinum* (ที่ได้จากข้อ 3.2.3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ ติดตามผลการ เจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อใน basal medium

ติดตามผลการทดลองโดยทำการวัด

- cell content โดยวิธี viable plate count (ภาคผนวก ข.)
- cellulose content (Watanabe and Yamanaka ,1995) (ภาคผนวก ข.)
- ความหนาของวุ้นที่เกิดขึ้น โดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์

คัดเลือก fraction ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Acetobacter xylinum* และสามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงสุด

3.2.5.4 ศึกษาผลของ fraction ที่คัดเลือกได้ ต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (อังคณา พันธ์ศรี, 2541)ที่เตรียมให้มีความเข้มข้น 2 เท่า (ภาคผนวก ก) โดยนำ fraction นั้นใส่รวมกับอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (อังคณา พันธ์ศรี, 2541) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร จากนั้นเติมเชื้อ *Acetobacter xylinum* (ได้จากข้อ 3.2.3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ ติดตามผลการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (อังคณา พันธ์ศรี, 2541)

ติดตามผลการทดลองโดยทำการวัด

- cell content โดยวิธี viable plate count (ภาคผนวก ข.)
- cellulose content (Watanabe and Yamanaka ,1995) (ภาคผนวก ข.)
- ความหนาของวุ้นที่เกิดขึ้น โดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์

คัดเลือก fraction ที่มีผลทำให้การเจริญของเชื้อ *Acetobacter xylinum* ดีที่สุดและสามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงสุด

3.2.5.5 ศึกษาองค์ประกอบของ fraction ที่มีผลทำให้การเจริญของเชื้อ *Acetobacter xylinum* ดีที่สุดและสามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงสุดที่อุณหภูมิสูง

นำ fraction ที่มีผลทำให้การเจริญของเชื้อ *Acetobacter xylinum* ดีที่สุดและสามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงสุดที่อุณหภูมิสูง มาศึกษาองค์ประกอบที่สำคัญ โดยทำการศึกษาวิเคราะห์

- ปริมาณโปรตีน (Lowry และ คณะ, 1951) (ภาคผนวก ข.)
- ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Dubois และคณะ, 1956) (ภาคผนวก ข.)
- ปริมาณสารประกอบ phenolic ในรูป gallic acid (ภาคผนวก ข.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การแยกเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิสูงจากผลไม้ต่าง ๆ

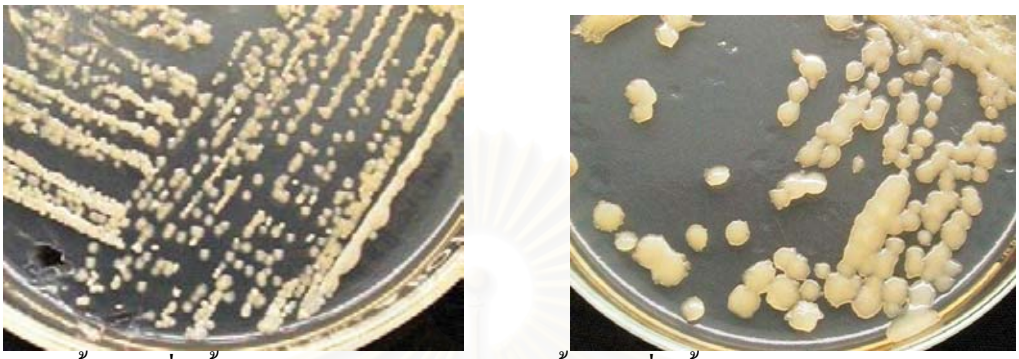
จากการทดลองได้เก็บตัวอย่างจากผลไม้สุกงอม ได้แก่ แอปเปิ้ล กล้วยหอม น้อยหน่า ฝรั่ง ลางสาด ลำไย สับปะรด เงาะ สตรอเบอรี่ มังคุด เพราะมีปริมาณน้ำตาลค่อนข้างสูง และทำการแยกเชื้อจากผลไม้เหล่านี้ บนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ โดยเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารและมีการเกิดวงใส จากการสร้างกรด นำเชื้อที่แยกได้ไป streak ซ้ำเพื่อให้เชื้อมีความบริสุทธิ์ สามารถคัดแยกเชื้อแอซิดแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 108 ไอโซเลต (ตารางที่ 4) เมื่อย้อมแกรมและตรวจลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเซลล์ติดสีแดงของแกรมลบ จากนั้นนำมาทดสอบเพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารน้ำมะพร้าวชนิดเหลว พบเชื้อแบคทีเรีย 29 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิห้อง (30 °ซ) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการแยกเชื้อที่สร้างแผ่นวุ้นได้จากผลไม้ชนิดต่างๆ

ชนิดผลไม้	จำนวน isolate	จำนวน isolate ที่สร้างวุ้นได้
ฝรั่ง	25	17
เงาะ	10	7
ลางสาด	10	0
แอปเปิ้ล	10	1
น้อยหน่า	10	0
สับปะรด	10	2
ลำไย	10	0
กล้วยหอม	10	0
มังคุด	5	1
สตรอเบอรี่	8	1
รวม	108	29

เมื่อนำเชื้อที่สร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิห้องไปศึกษาการเจริญและการผลิตวุ้นเซลลูโลส โดยเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 37°ซ 40°ซ และ 42°ซ พบแบคทีเรียที่สร้างเซลลูโลสได้ทั้งสิ้น 24 16 และ 5 ไอโซเลต ตามลำดับ จึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อสร้างเซลลูโลสที่พบ

อาจจะเป็น *Acetobacter* sp. เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 29 ไอโซเลตมา streak บนอาหารแข็งน้ำมะพร้าวพบโคโลนีที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร โคโลนีที่พบมีความแตกต่างกันในเชื้อแต่ละไอโซเลต ลักษณะโคโลนีที่พบ มีทั้งแบบกลมนูน ขอบเรียบ ขอบหยัก ผิวเป็นมันเงา มีสีครีมเข้ม และสร้างเมือกได้ ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อที่streak บนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว ดังรูปที่ 11



ก. เชื้อ G9 เมื่อเลี้ยงครบ 3 วัน ข. เชื้อ G9 เมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน

รูปที่ 11 ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่คัดแยกได้ เมื่อ streak ลงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว

4.2 การ Identified เชื้อที่คัดแยกได้ เพื่อยืนยันว่าเป็น *Acetobacter xylinum*

จากการทดลองข้างต้น เมื่อนำโคโลนีที่ได้มาย้อมแกรมและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเชื้อทั้ง 29 ชนิดย้อมติดสีแกรมลบ เซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง เมื่อศึกษาลักษณะทางชีวเคมีบางประการของเชื้อทั้ง 29 ชนิด (De Ley and Fratuer, 1974) เปรียบเทียบกับ *Acetobacter xylinum* TISTR893 พบว่าเชื้อ 20 ชนิด มีลักษณะไม่แตกต่างกัน ปฏิกิริยาที่สำคัญในการตรวจสอบเชื้อคือ การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชันของอะซิเตท (Oxidation of acetate) ให้ผลการทดสอบเป็นเบสิค คือเชื้อสามารถออกซิเดชันอะซิเตทไปเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ได้(Asai และคณะ,1964) และเชื้อยังสามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase test) บนอาหารวุ้น GYPG ได้ (Asai และคณะ,1964) เป็นการบ่งชี้เบื้องต้นได้ว่า เชื้อที่แยกได้มีความน่าจะเป็น *Acetobacter xylinum* (De Ley and Fratuer, 1974) (ตารางที่ 5) และเมื่อนำเชื้อที่เจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิสูงทั้ง 3 ระดับ จำนวน 5 สายพันธุ์ไปตรวจสอบ 16 s rDNA sequence analysis ด้วยโปรแกรม BLASTn จาก DDBJ database เทียบกับเชื้อ *Acetobacter europaeus* *Gluconoacetobacter* sp. DST GL_01 *Acetobacter xylinus* และ *Acetobacter* sp. ITDI2.1 ผลการตรวจสอบพบว่า เชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ มีลำดับเบสเหมือนกับเชื้อที่ใช้ในการเปรียบเทียบ มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเชื้อทั้ง 4 ชนิด 100% (ตารางที่ 6) และเมื่อพิจารณาควบคู่กับผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ พบว่าเชื้อที่ได้เป็น *Acetobacter xylinum*

ตารางที่ 5 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ 29 ชนิด เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *Acetobacter xylinum* TISTR 893

Characteristic	G1/3	G3	G9	G9/1	G9/2	G9/7	G10	G10/2	G11	G12	G13	G15	G16	G18	TISTR 893
cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Gram reaction	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Catalase test	**+**	-	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	-	**+**	**+**	**+**
Oxidation of acetate	**basic**	**basic**	**basic**	**basic**	**basic**	**basic**	**basic**	**basic**	**basic**	**basic**	**basic**	**acid**	**basic**	**basic**	**basic**
Oxidation of lactate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Formation of															
- gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- cellulose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ลักษณะโคโลนี บนGEY-agar	**เหลืองเมือก**	**ขาว**	**เข้มเมือก**	**เหลืองเข้ม**	**ครีมเข้มเมือก**	**ครีมเข้มเมือก**	**ครีมเข้ม**	**เหลือง**	**ครีมเข้มเมือก**	**ครีมเข้ม**	**ครีมเข้ม**	**ครีม**	**ครีมเข้มเมือก**	**ครีมเข้มเมือก**	**ครีมเข้มเมือก**
Growth on:															
-Hoyer-Frateur medium	-	+	-	W	-	-	W	-	-	W	-	+	-	-	-
-Calcium lactate agar	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	w	-	+	+	+
-Glutamate agar	-	+	-	w	w	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-

w = weak

\+ คือ เชื้อสามารถสร้างสาร และ/หรือ เจริญได้บนอาหาร

\- คือ เชื้อไม่สามารถสร้างสาร และ/หรือ ไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ 29 ชนิด เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *Acetobacter xylinum* TISTR 893 (ต่อ)

Characteristic	R1	R2	R4	R5	R7	R9	R9/2	P4	P7	ST7	MT2	G1	G1/1	G1/2	AP7	TISTR 893
cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Gram reaction	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Catalase test	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Oxidation of acetate	basic	basic	basic	basic	basic	basic	basic	basic	basic	basic	acid	basic	basic	acid	basic	basic
Oxidation of lactate	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Formation of																
- gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- cellulose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ลักษณะโคโลนี บนGEY-agar	ครีม เข้ม	ครีม เข้ม	ครีม จาง	ครีม เข้ม	เหลือง	ครีม เข้ม เมือก	ครีม เมือก	เหลือง	ครีม เข้ม เมือก	ครีม เข้ม	เหลือง เข้ม เมือก	ครีม เมือก	ครีม เข้ม	เหลือง เข้ม	ครีม เข้ม เมือก	ครีม เข้ม เมือก
Growth on:																
-Hoyer-Frateur medium	-	-	+	+	-	-	-	+	-	W	W	-	W	+	W	-
-Calcium lactate agar	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
-Glutamate agar	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-

w = weak

+คือ เชื้อสามารถสร้างสาร และ/หรือ เจริญได้บนอาหาร

-คือเชื้อไม่สามารถสร้างสารและ/หรือไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 Molecular Phylogenetic Identification of Microorganisms by partial 16s rDNA sequence analysis

Sample name	Closets sequence	% similarity	Accession number
R9	1. Acetobacter europaeus	554/554 (100%)	Y15289
	2. Gluconoacetobacter sp. DST GL_01	554/554 (100%)	AY180960
	3. Acetobacter xylinus	554/554 (100%)	AJ007698
	4. Acetobacter sp. ITDI2.1	554/554 (100%)	AF062475
R9/2	1. Acetobacter europaeus	554/554 (100%)	Y15289
	2. Gluconoacetobacter sp. DST GL_01	554/554 (100%)	AY180960
	3. Acetobacter xylinus	554/554 (100%)	AJ007698
	4. Acetobacter sp. ITDI2.1	554/554 (100%)	AF062475
G9	1. Acetobacter europaeus	554/554 (100%)	Y15289
	2. Gluconoacetobacter sp. DST GL_01	554/554 (100%)	AY180960
	3. Acetobacter xylinus	554/554 (100%)	AJ007698
	4. Acetobacter sp. ITDI2.1	554/554 (100%)	AF062475
G11	1. Acetobacter europaeus	554/554 (100%)	Y15289
	2. Gluconoacetobacter sp. DST GL_01	554/554 (100%)	AY180960
	3. Acetobacter xylinus	554/554 (100%)	AJ007698
	4. Acetobacter sp. ITDI2.1	554/554 (100%)	AF062475
G16	1. Acetobacter europaeus	554/554 (100%)	Y15289
	2. Gluconoacetobacter sp. DST GL_01	554/554 (100%)	AY180960
	3. Acetobacter xylinus	554/554 (100%)	AJ007698
	4. Acetobacter sp. ITDI2.1	554/554 (100%)	AF062475

4.3 การคัดเลือก *Acetobacter xylinum* ที่ผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูงสุดที่อุณหภูมิสูง

ขั้นต้นพบว่าเชื้อ 5 ชนิดที่สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ ที่อุณหภูมิสูง 37°ซ 40°ซ และ 42°ซ ได้แก่ R9 R9/2 G9 G11 และ G16

ผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 37°ซ เชื้อ R9 เจริญดีที่สุด มีปริมาณเชื้อสูงสุดคือ $3.55x10^5$ CFU/ml ผลิตปริมาณเซลลูโลสได้สูงสุด คือ 2.013 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลส 10.75 กรัม(กรัมต่อ 100 น้ำตาลที่ถูกใช้ไป) เมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน ความหนาวุ้นของเชื้อสูงสุด คือ 12.14 มิลลิเมตร รองลงมาคือ G9 G16 R9/2 และ G11 ตามลำดับ ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Characteristics / Isolate No.	G9	G11	G16	R9/2	R9
Cellulose (g dried weigth/1L media)	1.378±1.75	0.753±1.28	1.291±0.98	1.246±0.15	**2.013±0.58**
Cellulose production (g/100 g sugar consumption)	8.17±2.05	3.96±1.08	6.58±2.55	4.75±2.41	**10.75±0.25**
Thickness (mm)	9.57±0.35	6.54±1.65	8.43±2.41	7.25±1.97	**12.14±1.25**
Viable cell (CFU/ml)	3.44×10^5	1.79×10^5	3.41×10^5	3.13×10^5	**3.55×10^5**

ผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 40°ซ เชื้อ G16 เจริญดีที่สุด ปริมาณเชื้อสูงสุด 2.05x10^5 CFU/ml ผลิตเซลลูโลสได้สูงสุด 1.455 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลส 9.26 กรัม (กรัมต่อ 100 น้ำตาลที่ถูกใช้ไป) ความหนาของแผ่นวุ้นเซลลูโลสสูงสุด คือ 5.78 มิลลิเมตร รองลงมาคือ G9 R9 R9/2 และ G11 ตามลำดับ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

Characteristics / Isolate No.	G9	G11	**G16**	R9/2	R9
Cellulose (g dried weigth/1L media)	1.059 ± 2.55	0.299 ± 1.86	**1.455 ± 1.35**	0.763 ± 2.41	0.843 ± 1.58
Cellulose production (g/100 g sugar consumption)	6.59 ± 3.55	2.16± 2.54	**9.26±1.54**	3.75 ± 2.21	5.43 ± 2.05
Thickness (mm)	4.75±1.34	3.25±0.78	**5.78±0.58**	3.97±0.85	4.12±1.57
Viable cell (CFU/ml)	1.44×10^5	1.68×10^4	**2.05×10^5**	2.13×10^4	2.98×10^4

ผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 42°ซ เชื้อ G9 เจริญดีที่สุด ปริมาณเชื้อสูงสุดคือ 1.25x10^5 CFU/ml ผลิตเซลลูโลสได้สูงสุดคือ 1.015 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลส 7.15 กรัม (กรัมต่อ 100 น้ำตาลที่ถูกใช้ไป) ความหนาวุ้นสูงสุด คือ 3.96 มิลลิเมตร รองลงมาคือ G16 R9 R9/2 และ G11 ตามลำดับ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่าวิเคราะห์ต่างๆ ณ วันที่ 7 เมื่อ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

Characteristics / Isolate No.	G9	G11	G16	R9/2	R9
Cellulose (g dried weigth/1L media)	1.015±1.57	0.121±2.45	0.854±1.97	0.544±2.65	0.785±3.77
Cellulose production (g/100 g sugar consumption)	7.15±0.98	1.96±1.05	6.15±1.25	3.15±2.54	4.9±2.75
Thickness (mm)	3.96±0.25	0.25±0.97	1.75±1.75	0.97±2.64	1.12±2.89
Viable cell (CFU/ml)	1.25×10^{5}	1.01×10^{4}	1.02×10^{5}	1.25×10^{4}	1.68×10^{4}

การเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อที่แยกได้ที่อุณหภูมิสูง พบว่าเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ดีที่สุดที่ อุณหภูมิสูง 37 °ซ รองลงมาคือที่ 40°ซ และ42°ซ ตามลำดับ ที่ 37 °ซ เชื้อ R9 เจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้สูงสุด ที่ 40°ซ เชื้อ G16 เจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้สูงสุด และ 42°ซ เชื้อ G9 เจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้สูงสุด พบว่าอัตราการผลิตเซลลูโลสของเชื้อลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น Lapus และคณะ(1967) คือ ที่ 42 °ซ ต่ำกว่าที่ 40°ซ และ 37 °ซ ตามลำดับ สอดคล้องกับ Moonmungmee และคณะ (2002) ซึ่งศึกษาการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacte*r sp.SKU 1100 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ 37°ซ และ 40 °ซ ซึ่งคัดแยกได้จากผลไม้ในประเทศไทย พบว่า เชื้อสามารถเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้หนาที่อุณหภูมิ 30 มากกว่า 37°ซ และ 40 °ซ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูง ในงานวิจัยได้เชื้อ R9 ให้ผลผลิตเซลลูโลส 2.013 กรัมต่อลิตรที่ 37° ซ และ G16 ผลิตเซลลูโลสได้ 1.455 กรัมต่อลิตรที่ 40 °ซ ซึ่งสูงกว่าการทดลองของ Moonmangmee และคณะ (2002) ซึ่งเลี้ยง *Acetobacte*r sp.SKU 1100 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37°ซ สร้างเซลลูโลสได้ 1.0 กรัมต่อลิตร และ 40 °ซ สร้างเซลลูโลสได้ 0.45 กรัมต่อลิตร ซึ่ง

Moonmangmee และคณะ (2002) พบว่าเชื้อที่แยกได้เป็นThermotolerrant strain และสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูงได้ซึ่งจากงานวิจัยในครั้งนี้คาดว่าจะสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูงได้ดีเช่นกัน

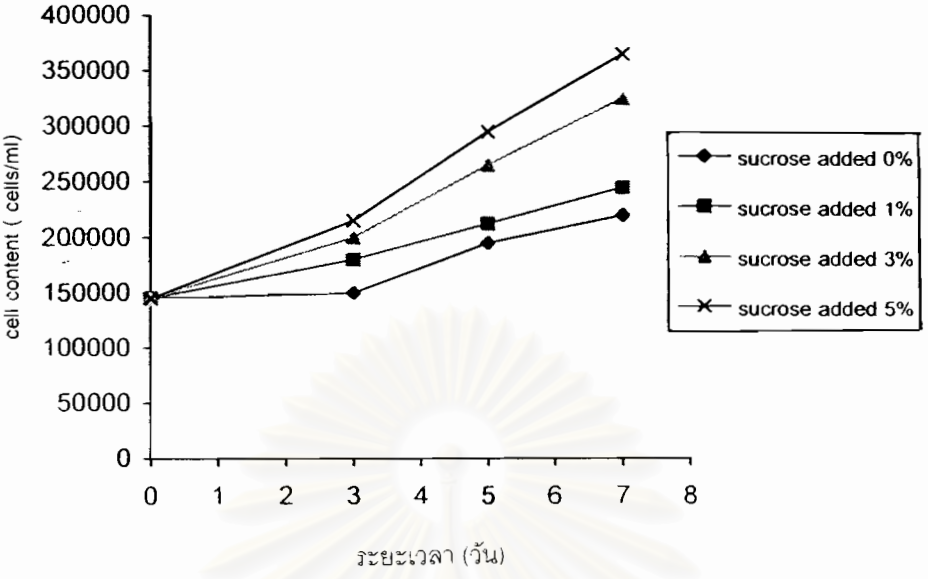
ในงานวิจัยนี้พบว่าเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ทั้ง 3 ระดับอุณหภูมิ แต่เชื้อที่สามารถเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิสูง 42 °ซ และเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ดีทั้งที่ 37 °ซ และ 40 °ซ คือ G9 จึงได้นำเชื้อ สายพันธุ์ G9 มาศึกษาอิทธิพลของปริมาณสารอินทรีย์แต่ละชนิดต่อความสามารถในการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูง คือ 37 °ซ 40 °ซ และ 42 ° ซ ต่อไป

4.4 ศึกษาอิทธิพลของปริมาณสารอินทรีย์แต่ละชนิดต่อความสามารถในการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง

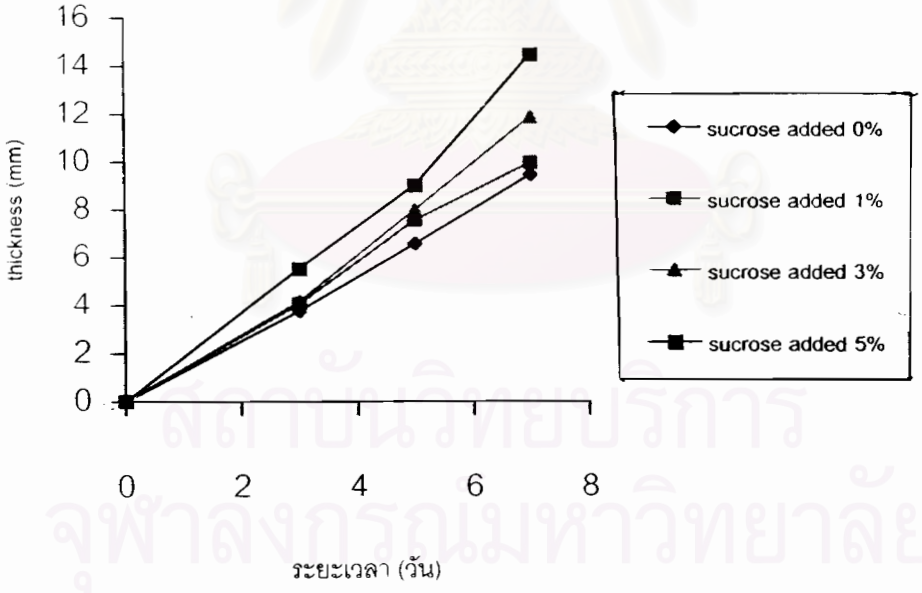
4.4.1 ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลซูโครสต่อการสร้างเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง

ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ประกอบด้วยสารอาหารคาร์บอนที่สำคัญ คือ น้ำตาล ซึ่งเติมลงไปในรูปของน้ำตาลซูโครส ในงานวิจัยนี้ตรวจสอบพบว่าในน้ำมะพร้าวที่ใช้ มีปริมาณน้ำตาลอยู่ทั้งสิ้น 3.07 % (w/v) ซูโครสจะถูกเอ็นไซม์ sucrose phosphoryrase คะตะไลส์เป็นกลูโคสและฟรุกโตส จากนั้นจึงจะเข้าสู่กระบวนการใช้สารอาหารเพื่อสร้างพลังงาน ATP และเป็นสารตั้งต้นของสาย polyglucan chain ของเส้นใยเซลลูโลส (Tonouchi และคณะ.,1998) โดยสารอาหารคาร์บอน หรือ น้ำตาลในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวจะถูกนำไปใช้ในการสร้างสารเมตาบอไลท์ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดกลูโคนิก และเซลลูโลส

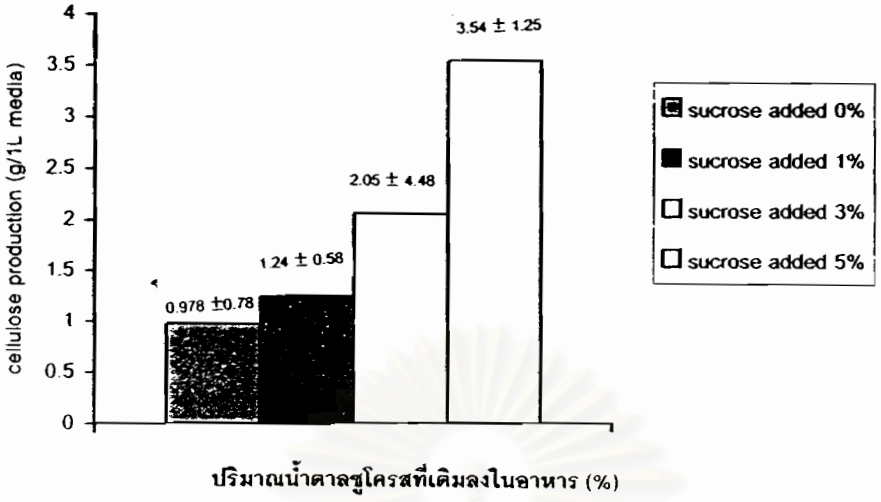
ที่อุณหภูมิ 37°ซ การเติมน้ำตาลซูโครส 5 % (w/v) ในอาหารน้ำมะพร้าวปริมาณเซลล์เพิ่มสูงขึ้นตลอดการทดลอง (รูปที่ 12)ให้ความหนาวุ้นสูงสุดคือ 14.91 มิลลิเมตร (รูปที่ 13) ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด คือ 3.54 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 14) อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลส 12.17 กรัม (กรัม/100 น้ำตาลที่ถูกใช้) รองลงมาคืออาหารน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 % (w/v) 1 % (w/v) และ 0 % (w/v) ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองในขณะที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครสพบว่า มีความหนาวุ้นน้อยกว่า 22.81% ผลผลิตเซลลูโลสต่ำกว่าที่เติมน้ำตาล 8 % (w/v) ถึง 75.87%และอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลสน้อยกว่า 48.95%



รูปที่ 12 จำนวนเซลล์ที่ผลิตโดย *Acetobacter* ทั้ง 5 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37° ซ

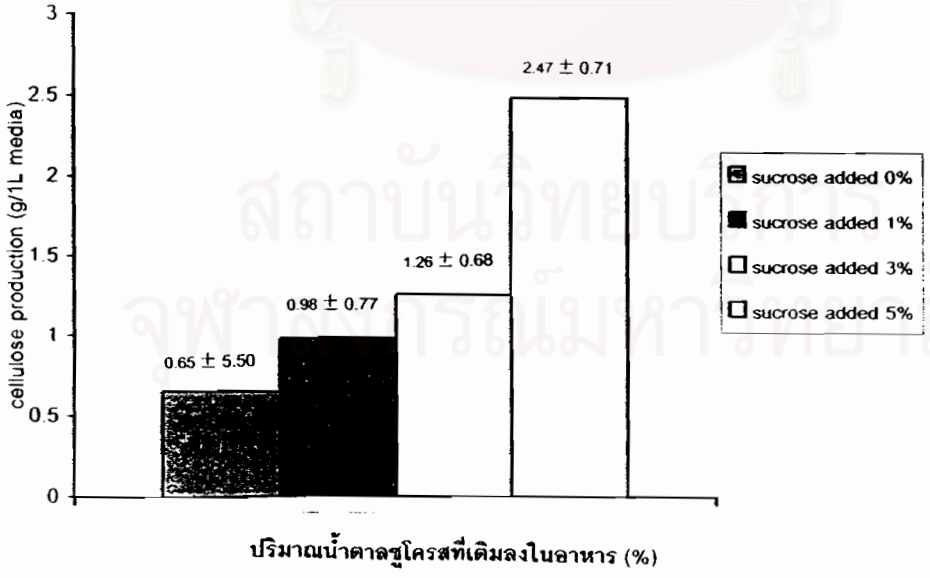


รูปที่ 13 ความหนาของวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ37° ซ

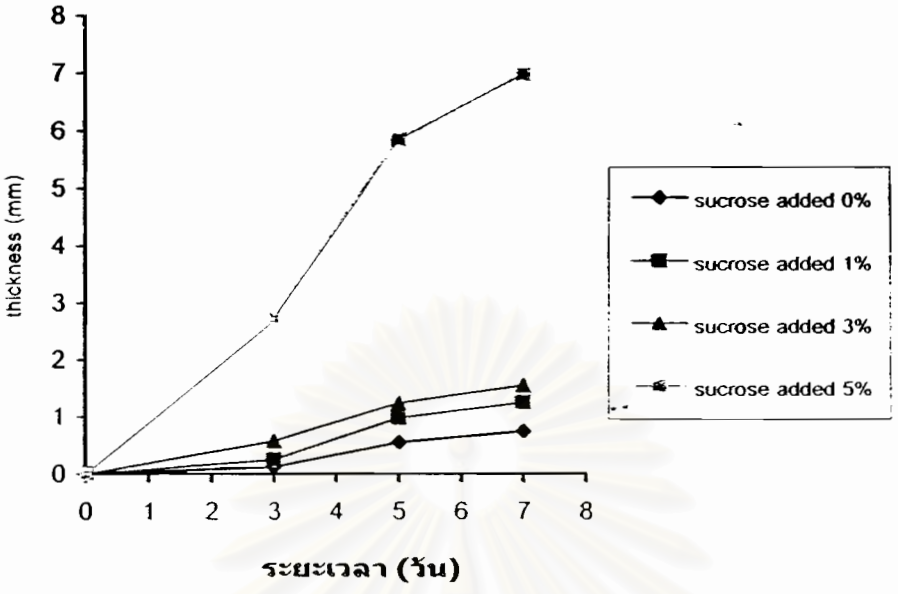


รูปที่ 14 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงใน อาหารน้ำมะพร้าว ที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37° ซ เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน

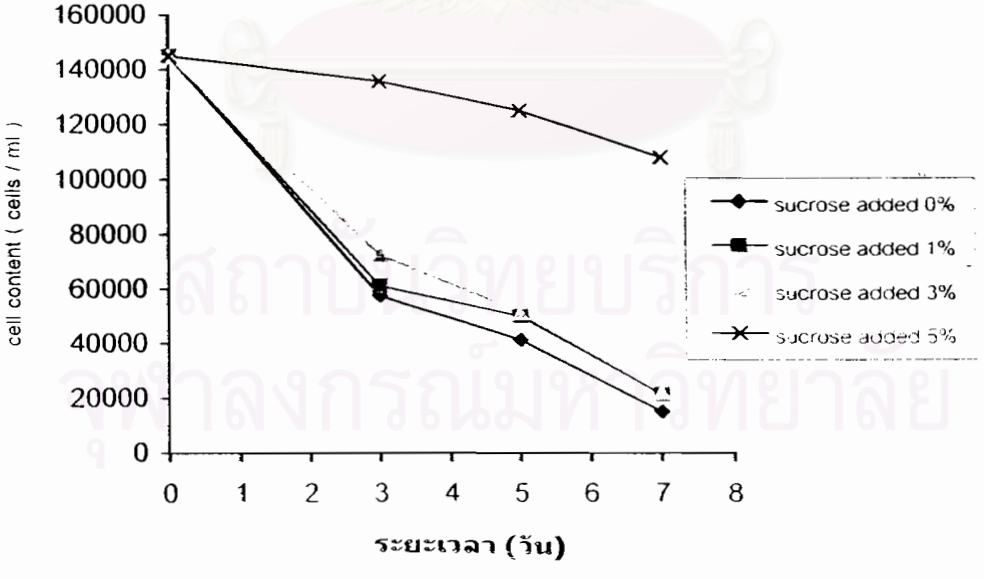
ผลการทดลองที่ 40° ซ พบว่าระดับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเติมลงไป 5% (w/v) เชื้อ G9 ให้ความหนาวุ้นสูงสุดคือ 7.12 มิลลิเมตร (รูปที่ 16) มีความหนาวุ้นสูงกว่าที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส 22.81% ผลผลิตเซลลูโลส 2.4771 กรัมต่อลิตร (ดังรูป 15)สูงกว่าไม่เติมน้ำตาลซูโครส 73.72% และอัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลลูโลสสูงกว่าถึง 78.95% จำนวนเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดการทดลอง(รูปที่ 17)



รูปที่ 15 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงใน อาหารน้ำมะพร้าว ที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 40° ซ

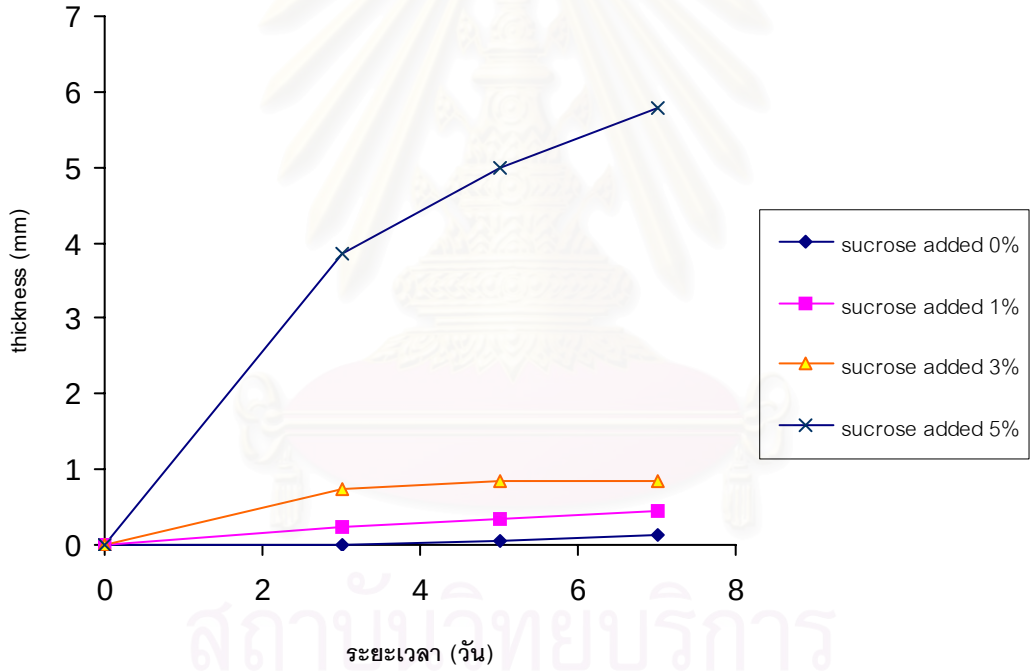


รูปที่ 16 ความหนาของวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 40° ซ

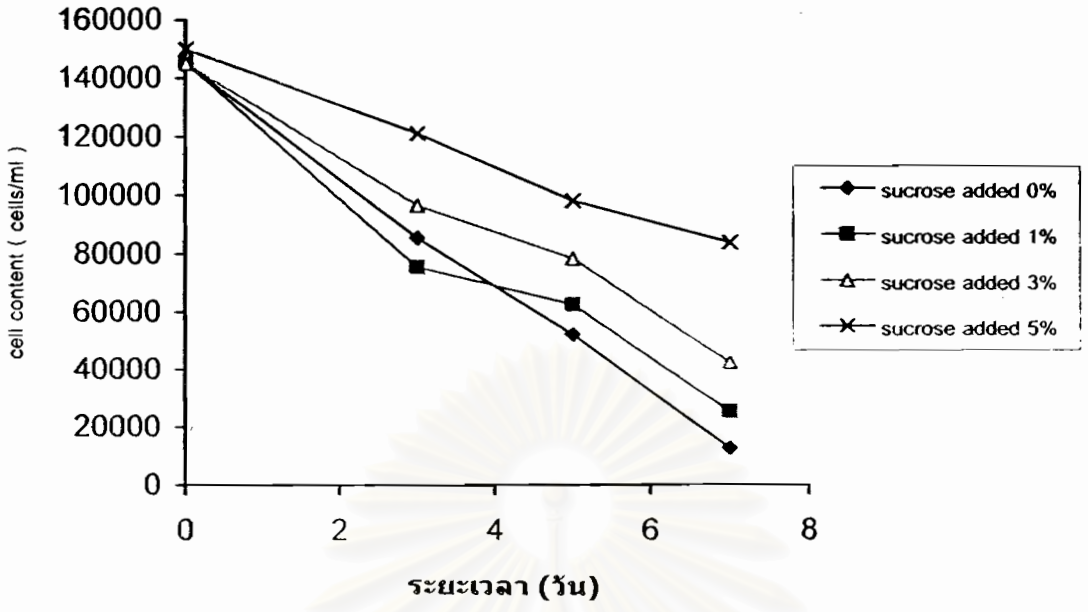


รูปที่ 17 จำนวนเซลล์ที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 40° ซ

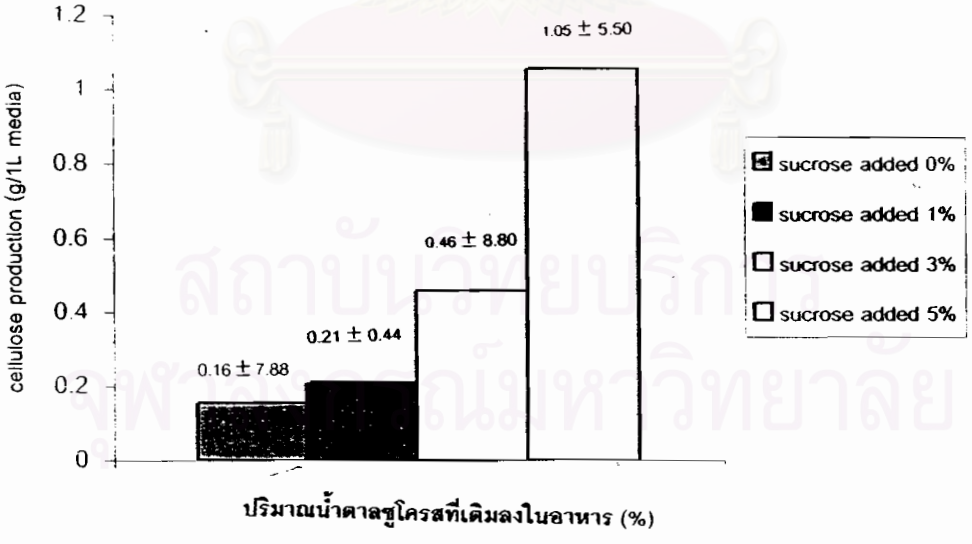
ผลการทดลองที่อุณหภูมิ 42 °ซ อาหารน้ำมะพร้าวที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 5 % (w/v) เชื้อ G9 ให้ความหนาวุ้นสูงสุดคือ 5.79 มิลลิเมตร (รูปที่ 18) ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้คือ 1.05 กรัมต่อลิตร(รูปที่ 20)อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นเซลลูโลส 8.07 กรัม (กรัม/100น้ำตาลที่ถูกใช้) ซึ่งสูงกว่าไม่เติมน้ำตาลซูโครส 3.33% และ 11.40% ตามลำดับ แผ่นวุ้นเซลลูโลสมีความหนาค่อนข้างต่ำ ปริมาณเซลล์ก็ลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 19) เนื่องจากในสภาวะการเลี้ยงมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นสูงซึ่งจากงานวิจัยของ Masuoka และคณะ(1993) กล่าวว่า ในระหว่างการหมักนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ใช้เลี้ยงจะลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากกรดกลูโคนิก ที่เชื้อสร้างขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้นเชื้อจะผลิตกรดกลูโคนิกมากขึ้น และส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลงมาก แม้ว่าการเติมกรดกลูโคนิกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ แต่การที่เชื้อเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิก จะทำให้มีสารตั้งต้นสำหรับการสร้างเซลลูโลสน้อยลง



รูปที่ 18 ความหนาของวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 42° ซ



รูปที่ 19 จำนวนเซลล์ที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 42° ซ



รูปที่ 20 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครสในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 42° ซ เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน

จากการทดลองดังกล่าวข้างต้น เมื่อเติมซูโครสลงในอาหารน้ำมะพร้าวพบว่า เชื้อสามารถเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้หนาขึ้น ปริมาณผลผลิตเซลลูโลสสูงขึ้น ปริมาณซูโครสที่เหมาะสมกับการสร้างแผ่นวุ้นของเชื้อที่ 37°ซ 40°ซ และ 42 °ซ คือ อาหารน้ำมะพร้าวที่เติมซูโครส 5 % (w/v) เมื่อพิจารณาอัตราเร็วในการสร้างแผ่นวุ้นที่ 37 °ซ พบว่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 40°ซ และ 42 °ซ และปริมาณผลผลิตเซลลูโลสที่ได้พบว่าที่ 37 °ซ สูงกว่าที่อุณหภูมิ 40°ซ และ 42 °ซ เช่นกัน

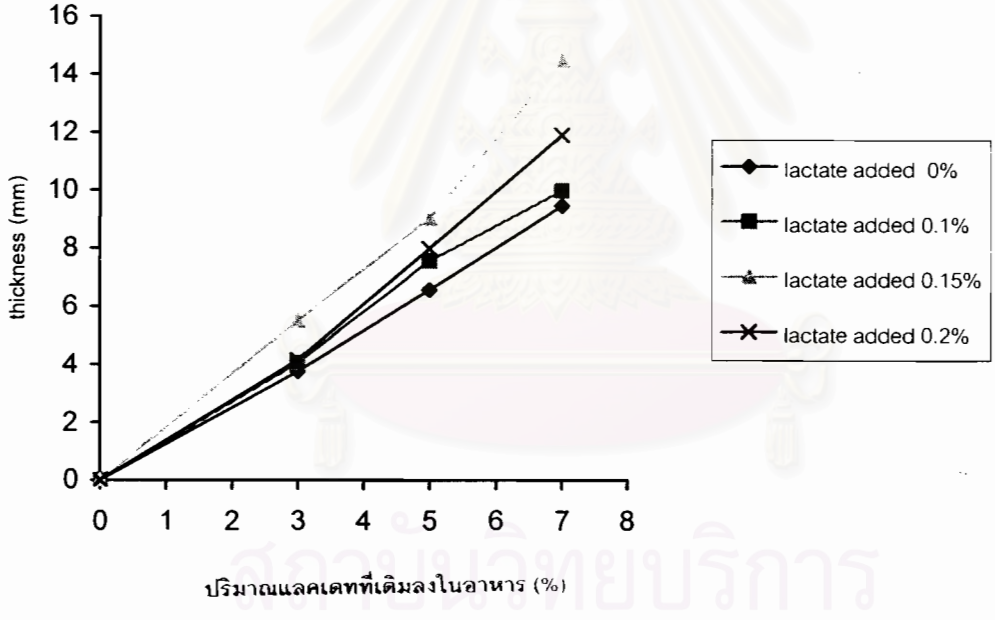
เชื้อ G9 สามารถเจริญและสร้างแผ่นวุ้นได้ ทั้งที่อุณหภูมิ 37°ซ 40°ซ และ 42 °ซ และเมื่อเพิ่มสารอาหารคาร์บอนคือ น้ำตาลซูโครสเข้าไปในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่มีน้ำตาลอยู่แล้ว 3.07 %(w/v)พบว่าเชื้อสามารถสร้างเซลลูโลสได้ดีที่สุดเมื่อเติมซูโครสลงไปในปริมาณ 5 %(w/v) เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Akira และคณะ (1997) ซึ่งศึกษาการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของ *A.xylinum* BPR2001 ในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ โดยใช้ น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นกัน ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมคือ 4% (w/v) ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้ 1.8 กรัมต่อลิตร ในขณะที่งานวิจัยครั้งนี้เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวที่ปรับปริมาณน้ำตาลซูโครสเป็น 4% (w/v) ให้ผลผลิตเซลลูโลส 0.997 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าในงานวิจัยของ Akira และคณะ (1997) แต่ในงานวิจัยนี้ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมในอาหารน้ำมะพร้าวคือ 8% (w/v) ซึ่งมีการเติมน้ำตาลซูโครสไปอีก 5% (w/v) จากเดิมที่ในน้ำมะพร้าวมีน้ำตาลอยู่แล้ว 3.07%(w/v) ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงถึง 3.54 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่า งานวิจัยของ Akira Seto และคณะ,1997 ถึง 1.97 เท่า และการทดลองในครั้งนี้พบว่า น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *A.xylinum* G9 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Alban(1962) รายงานว่า น้ำตาลซูโครสที่เหมาะสม อยู่ในช่วง 5-8% ซึ่งให้ความหนาของแผ่นวุ้นสูงสุด และให้ผลคุ้มค่าทางการค้า

4.4.2 ศึกษาปริมาณแลคเตทที่เหมาะสมสำหรับเชื้อต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง

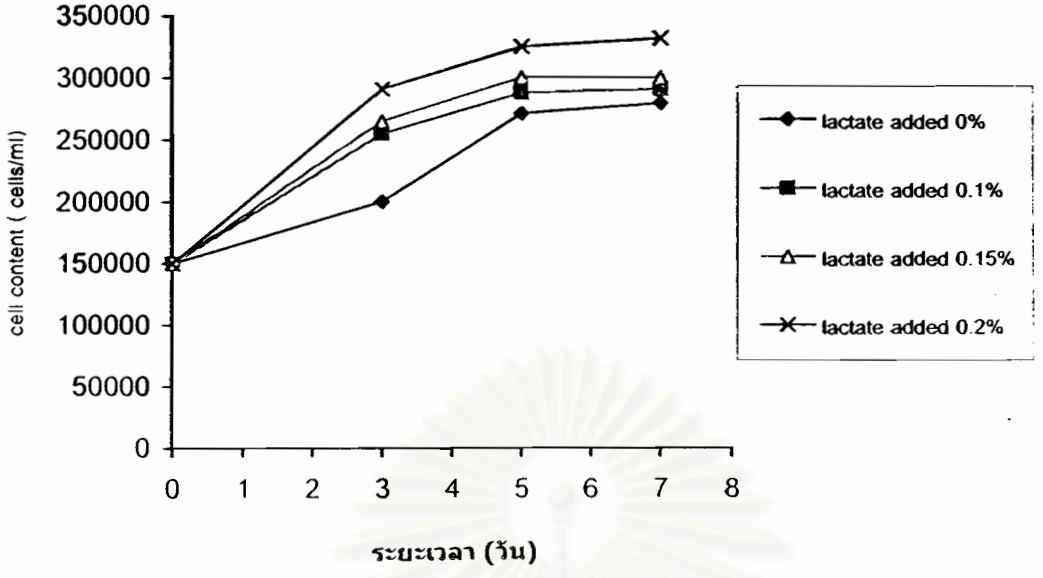
Matsuoka และคณะในปี 1996 ได้ทำการทดสอบแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ได้แก่ corn steep liquor (CSL), soytone, yeast extract และ peptone พบว่า CSL เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter xylinum* subsp. Sucrofermentans BPR 2001 เนื่องจากพบว่าเฉพาะ CSL เท่านั้นที่มีแลคเตทเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเมื่อเติมแลคเตทลงในแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ จึงมีผลให้การสร้างเซลลูโลสของเชื้อเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่ใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อด้วย CSL และยังพบว่าแลคเตทกระตุ้นการเจริญของเซลล์ในช่วงต้นของการเลี้ยงและทำหน้าที่เชื่อมต่อห่วงโซ่หายใจและการสร้างพลังงานเพื่อการเจริญ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า แลคเตทเป็นตัวเร่งการ

ขับเคลื่อน TCA cycle ได้ดี พอๆกับเป็นตัวสร้างพลังงาน ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณเซลลูโลสและการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น

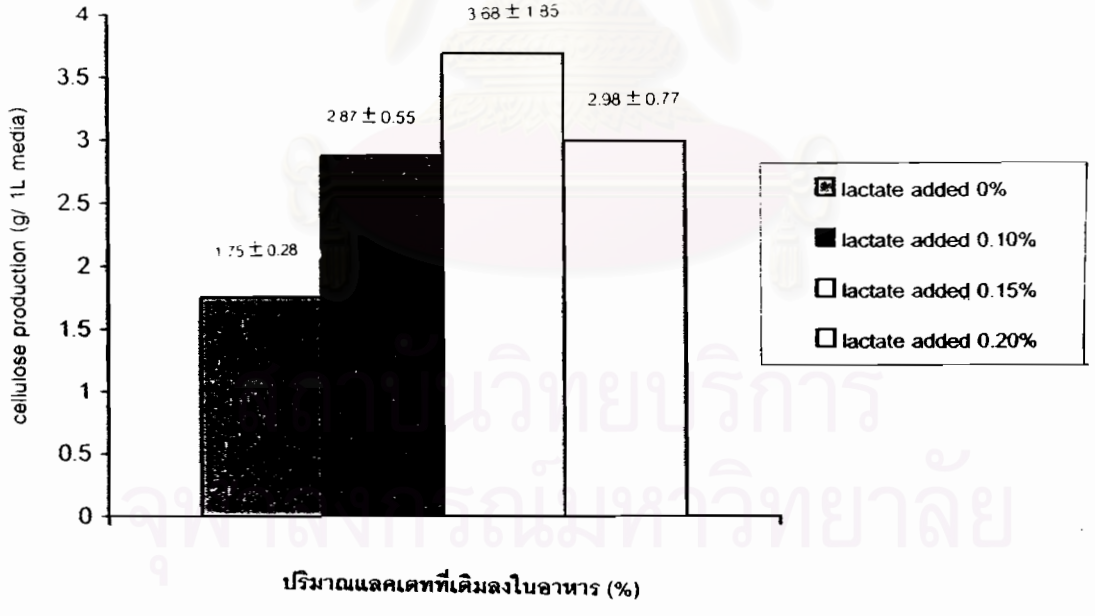
ผลการทดลองที่ 37 °ซ เชื้อ *Acetobacter* G9 สร้างวุ้นได้หนาที่สุด 15.03 มิลลิเมตร(รูปที่ 21) เมื่อเติมแลคเตทลงในอาหารน้ำมะพร้าวในปริมาณ 0.15 %(v/v) คิดเป็น 1.3 เท่าของที่ไม่เติมแลคเตท รองลงมาคือแลคเตทในปริมาณ0.20 %(v/v) แลคเตท 0.10 %(v/v) ในอาหารมีจำนวนเซลล์มากที่สุด ค่าความเป็นกรดด่างลดลงทุกระดับความเข้มข้นซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น มีการใช้น้ำตาลไปมากที่สุด 32.51% (w/w) ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้คือ 3.68 กรัมต่อลิตร มากกว่าไม่เติมแลคเตทในอาหาร 52.45% อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นเซลลูโลส 13.52 กรัม(กรัม/100น้ำตาลที่ถูกใช้)ซึ่งสูงกว่าไม่เติมแลคเตทในอาหาร 39.57%สอดคล้องกับการทดลองของ Matsuoka และคณะ (1996) ซึ่งใช้แลคเตทปริมาณ 0.15 %(v/v) ร่วมกับอาหาร basal medium ทำให้เชื้อ *A.xylinum* subsp.*sucrofermentans* BPR 2001ทำให้เชื้อผลิตเซลลูโลสได้เพิ่มขึ้น 4.57 เท่า หรือเพิ่มขึ้นถึง 78.125%



รูปที่ 21 ความหนาวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 37 ° ซ

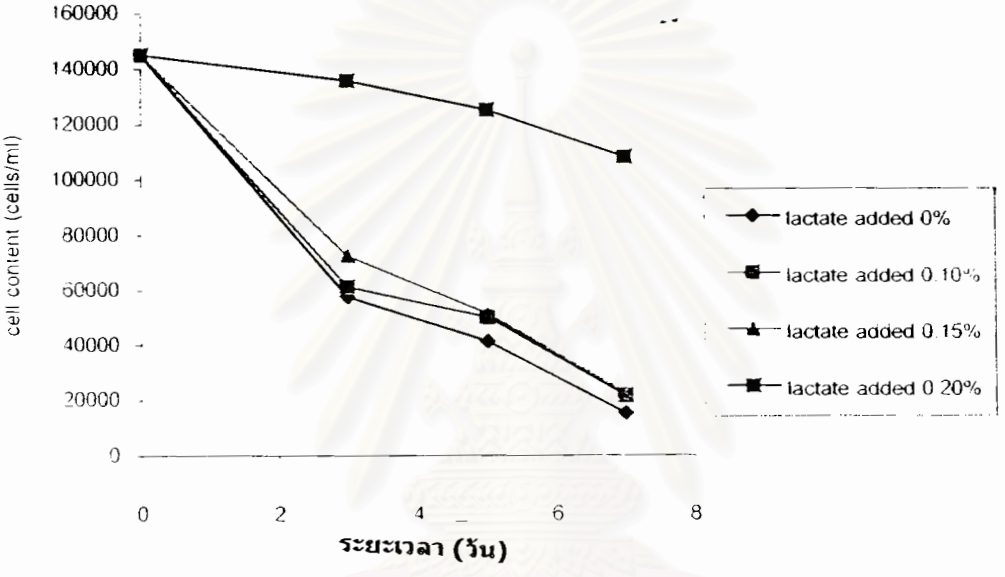


รูปที่ 22 จำนวนเซลล์ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 37°ซ



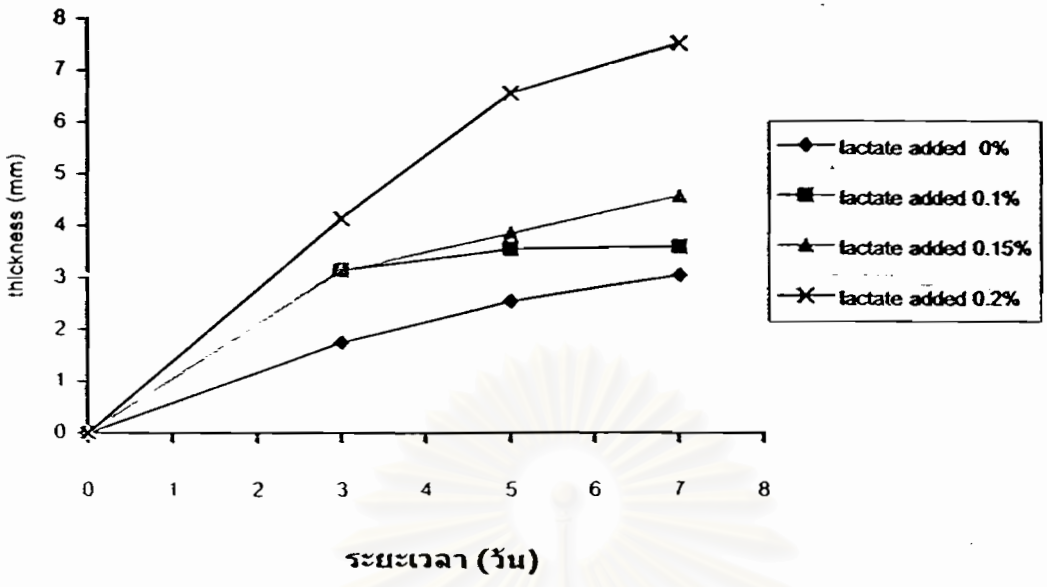
รูปที่ 23 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงใน อาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 37°ซ เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน

ผลการทดลองที่ 40 °ซ เชื้อ *Acetobacter* G9 สร้างวุ้นได้หนาที่สุด 7.55 มิลลิเมตร (รูปที่ 25) เมื่อเติมแลคเตทลงในอาหารน้ำมะพร้าวในปริมาณ 0.20 %(v/v) ในอาหารมีจำนวนเซลล์มากที่สุด ค่าความเป็นกรดด่างลดลงทุกระดับความเข้มข้นซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น มีการใช้น้ำตาลไปมากที่สุด 28.83 % (w/w) ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้คือ 3.49 กรัมต่อลิตร มากกว่าไม่เติมแลคเตทในอาหาร 69.65% อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นเซลลูโลส 12.07 กรัม (กรัม/100 น้ำตาลที่ถูกใช้) ซึ่งสูงกว่าไม่เติมแลคเตทในอาหาร 45.40%

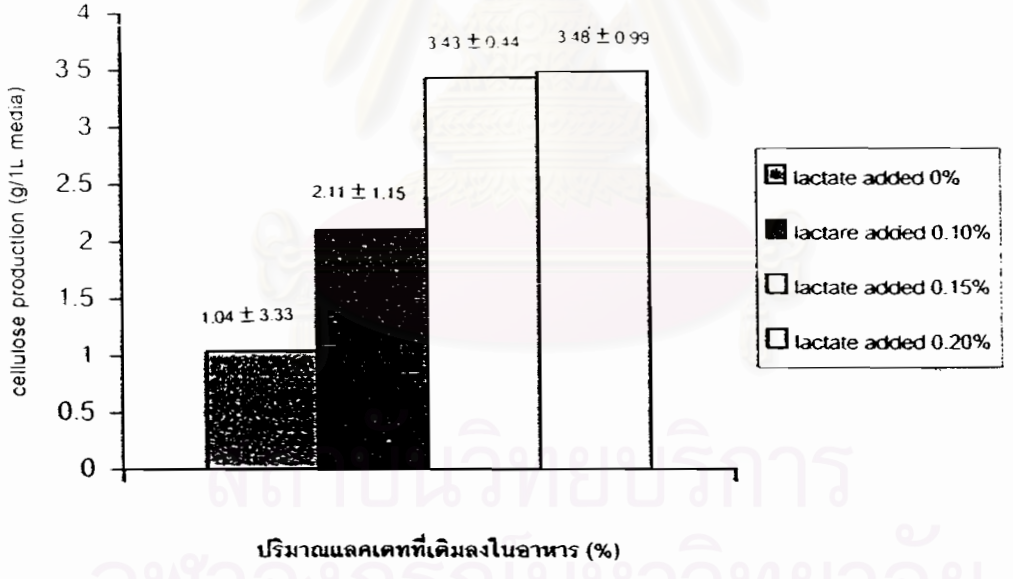


รูปที่ 24 จำนวนเซลล์ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 40°ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

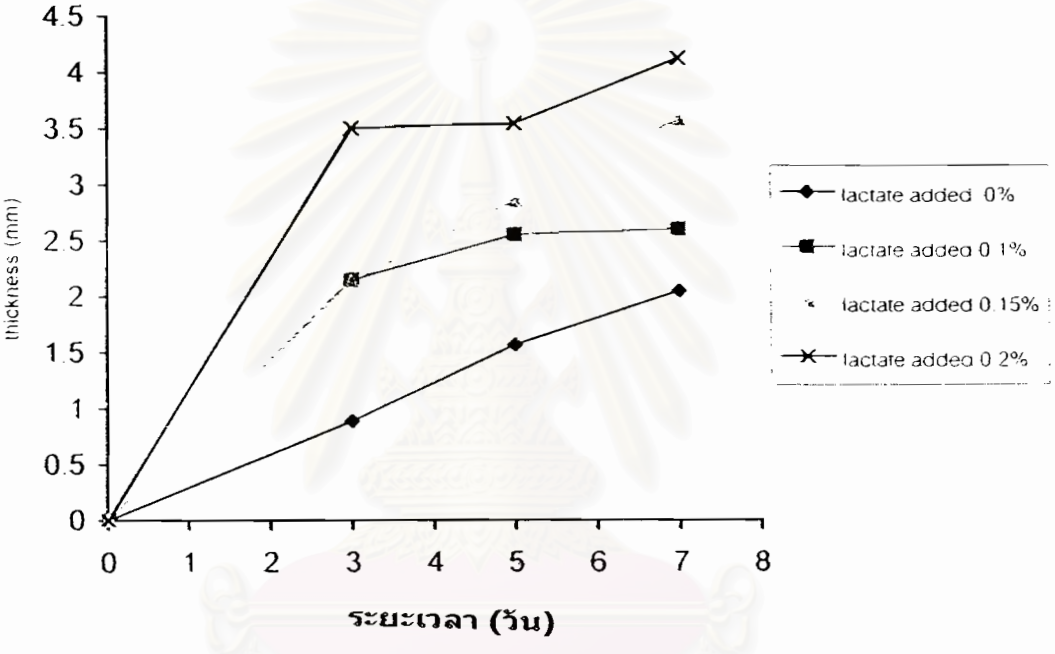


รูปที่ 25 ความหนาวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 40 ° ซ



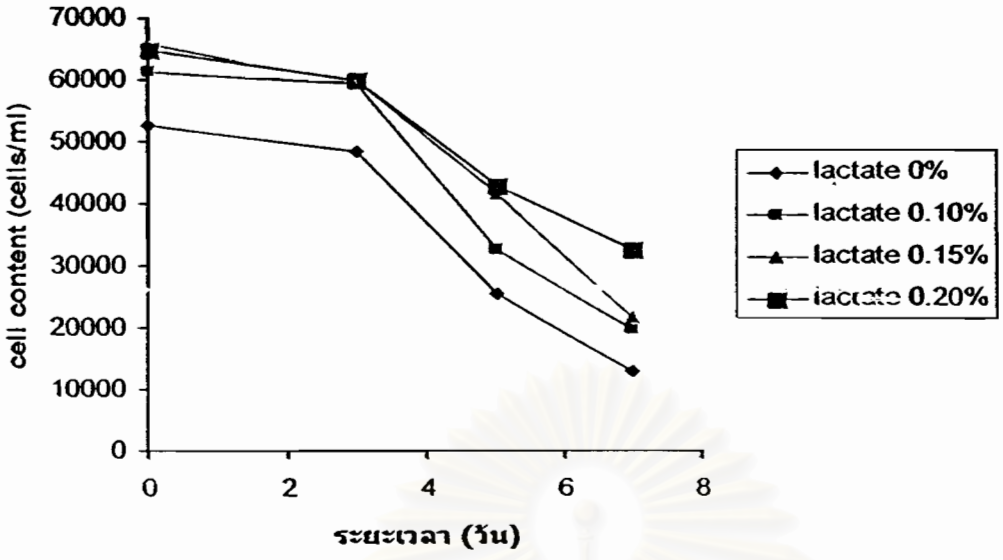
รูปที่ 26 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงใน อาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 40°ซ เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน

ผลการทดลองที่ 42 °ซ เชื้อ *Acetobacter* G9 สร้างวุ้นได้หนาที่สุด 4.12 มิลลิเมตร (รูปที่ 27) เมื่อเติมแลคเตทลงในอาหารน้ำมะพร้าวในปริมาณ 0.20 %(v/v) ในอาหารมีจำนวนเซลล์มากที่สุด (ดังรูปที่ 28) แต่มีแนวโน้มจำนวนเซลล์ลดลงเนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลงทุกระดับความเข้มข้น ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น มีการใช้น้ำตาลไปมากที่สุด 20.25% (w/w) ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้คือ 2.25 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 29)มากกว่าไม่เติมแลคเตทในอาหาร 54.89% อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นเซลลูโลส 11.13 กรัม(กรัม/100 น้ำตาลที่ถูกใช้)ซึ่งสูงกว่าไม่เติมแลคเตทในอาหาร 35 76%

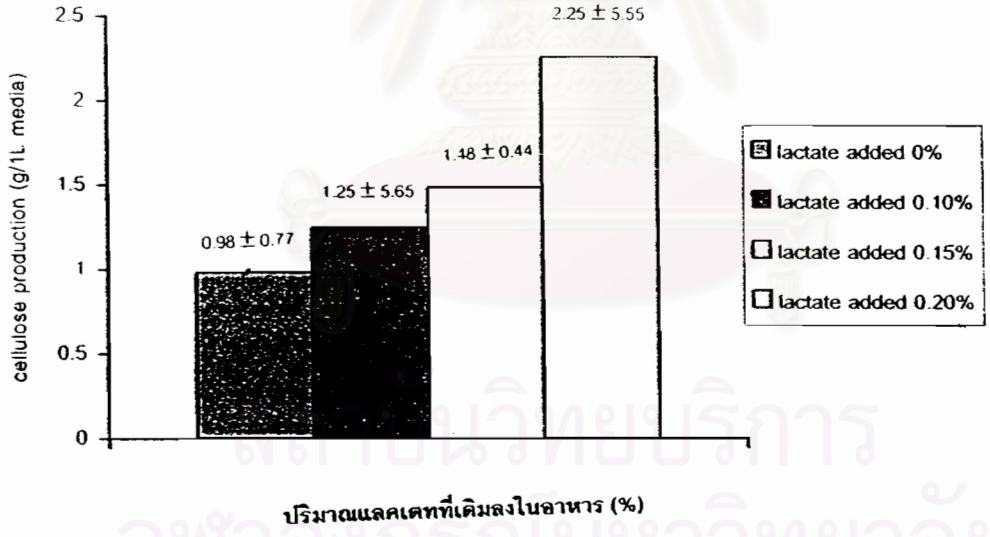


รูปที่ 27 ความหนาวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 42 °ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 28 จำนวนเซลล์ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 42°ซ



รูปที่ 29 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมแลคเตทในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 42°ซ เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน

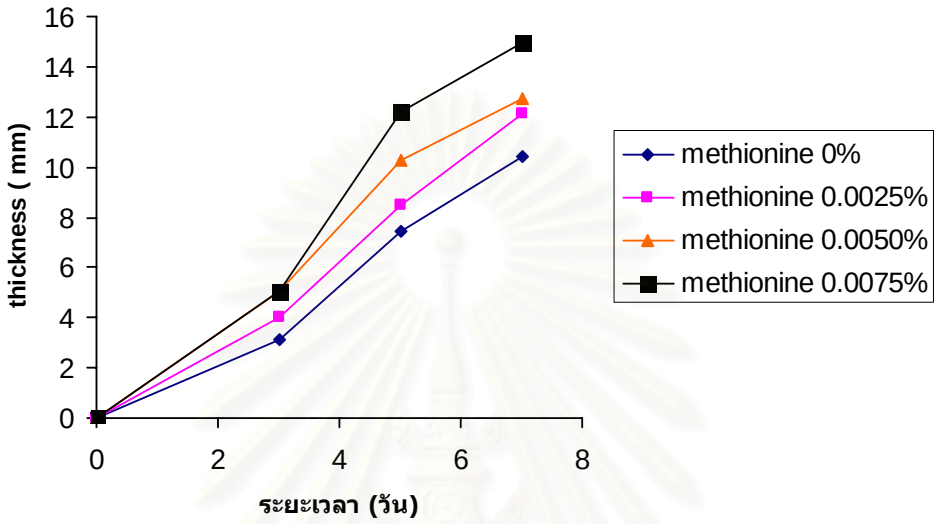
จากการทดลองพบว่า การเติมแลคเตทลงในอาหารน้ำมะพร้าวในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งในการทดลองนี้คือปริมาณแลคเตท 0.15%(v/v) ที่อุณหภูมิ 37°ซ และ 0.20%(v/v) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ และ 42°ซ แลคเตทช่วยให้เชื้อ G9 สามารถผลิตเซลลูโลสได้ในปริมาณที่สูงขึ้น 4-5 เท่า แม้ว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเซลลูโลสของเชื้อก็ตาม เพราะแลคเตทปริมาณที่เหมาะสมที่เติมลงไปในอาหารนั้น จะเป็นตัวช่วยสร้างพลังงาน และเข้าไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อและการผลิตเซลลูโลสในช่วงเริ่มแรก แลคเตททำหน้าที่เหมือนตัวเร่งการเจริญเติบโตและตัวเร่งการผลิตเซลลูโลส และยังทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับห่วงโซ่การหายใจและการผลิตพลังงานจากปฏิกริยาการเปลี่ยนแลคเตทเป็นไพรูเวท ซึ่งดูได้จากผลการสร้างเซลลูโลสที่สูงขึ้น (Naritomi และคณะ,1998) ในขณะที่จำนวนเซลล์ในการทดลองครั้งนี้มีแนวโน้มลดลงเนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลงซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นในทุกระดับความเข้มข้นของแลคเตทที่เติมลงไป และทุกระดับอุณหภูมิ ทำให้สภาวะไม่เหมาะสมต่อการดำรงอยู่และการเจริญของเชื้อ

4.4.3 ศึกษาผลของเมไธโอนีนต่อการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง และปริมาณเมไธโอนีนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นที่อุณหภูมิสูง

เมไธโอนีน เป็นกรดอะมิโน จึงจัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรียประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของเชื้อแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน และความต้องการยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นอีกเช่น พีเอช ออกซิเจน และ อุณหภูมิ เป็นต้น ตามธรรมชาติแล้วน้ำมะพร้าวมีสารประกอบไนโตรเจนอยู่ร้อยละ 0.4 (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ ,2539) *Acetobacter xylinum* สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ แต่อย่างไรก็ตามการเติมสารประกอบไนโตรเจนจะช่วยเร่งการเจริญและการสร้างเซลลูโลส โดยสารประกอบไนโตรเจนเกี่ยวข้องกับ nitrogenous regular gene บน cellulose synthase ได้แก่ acsAB, acsC และ acsD และปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่เติมลงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวจะต้องส่งเสริมการใช้น้ำตาลของเชื้อเพื่อการสร้างสารเมตาบอไลท์ต่างๆ โดยเฉพาะเซลลูโลส (Dudman, 1959)

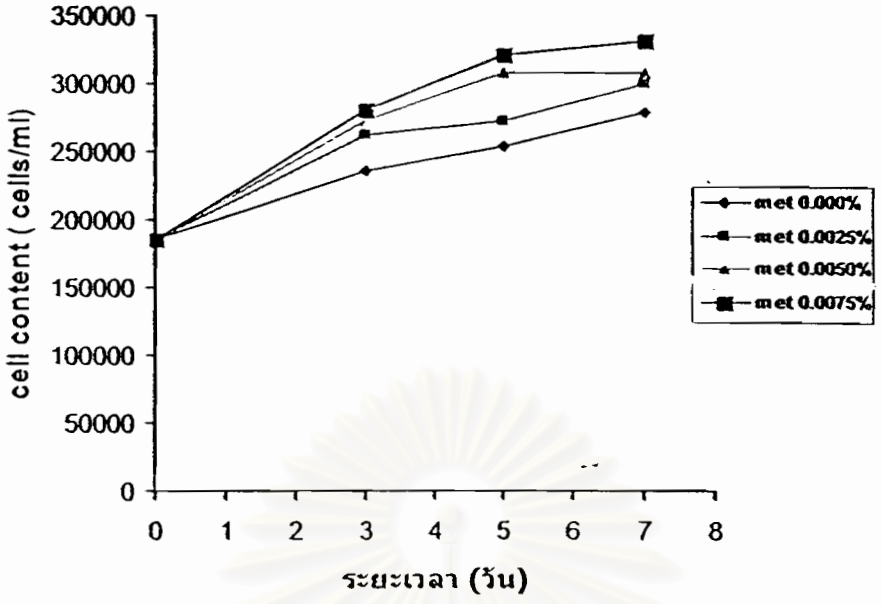
ผลการทดลองที่ 37 °ซ เชื้อ *Acetobacter* G9 สร้างวุ้นได้หนาที่สุด 14.78 มิลลิเมตร (รูปที่ 30) เมื่อเติมเมไธโอนีนลงในอาหารน้ำมะพร้าวในปริมาณ 0.0075% (w/v) คิดเป็น 13.73 เท่าของที่ไม่เติมเมไธโอนีน รองลงมาคือเมไธโอนีนปริมาณ 0.005% (w/v) และ 0.0025 %(w/v) ตามลำดับ ในอาหารมีจำนวนเซลล์มากที่สุด ค่าความเป็นกรดด่างลดลงทุกระดับความเข้มข้นซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น มีการใช้น้ำตาลไปมากที่สุด 25.48 % (w/w) ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้คือ 3.75 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 32) มากกว่าไม่เติมเมไธโอนีนในอาหาร 63.25% อัตราการ

เปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นเซลลูโลส 14.59 กรัม(กรัม/100 น้ำตาลที่ถูกใช้)ซึ่งสูงกว่าไม่เติมเมไธโอนีนในอาหาร 44.00%

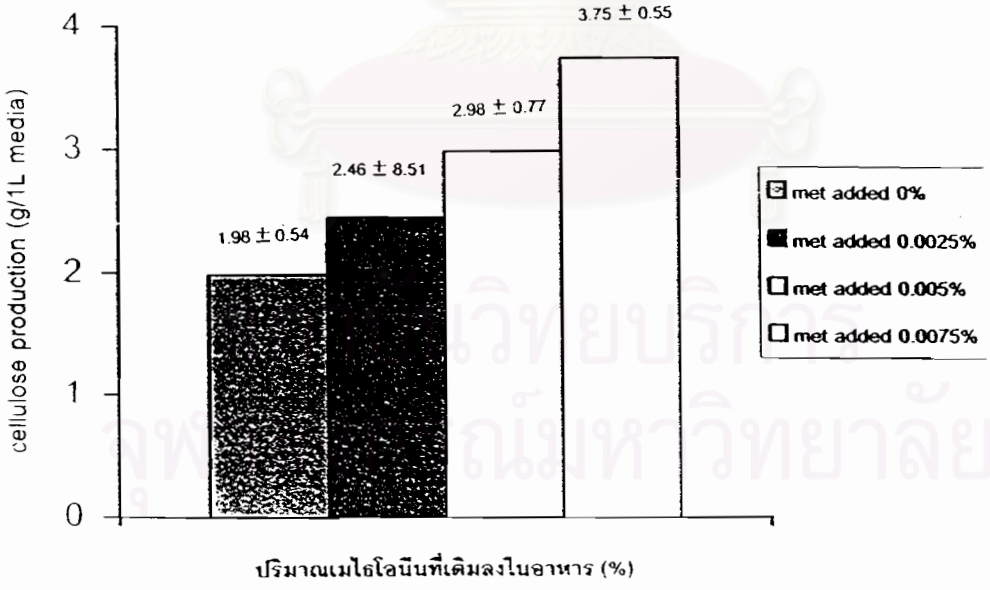


รูปที่ 30 ความหนาของวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37°ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

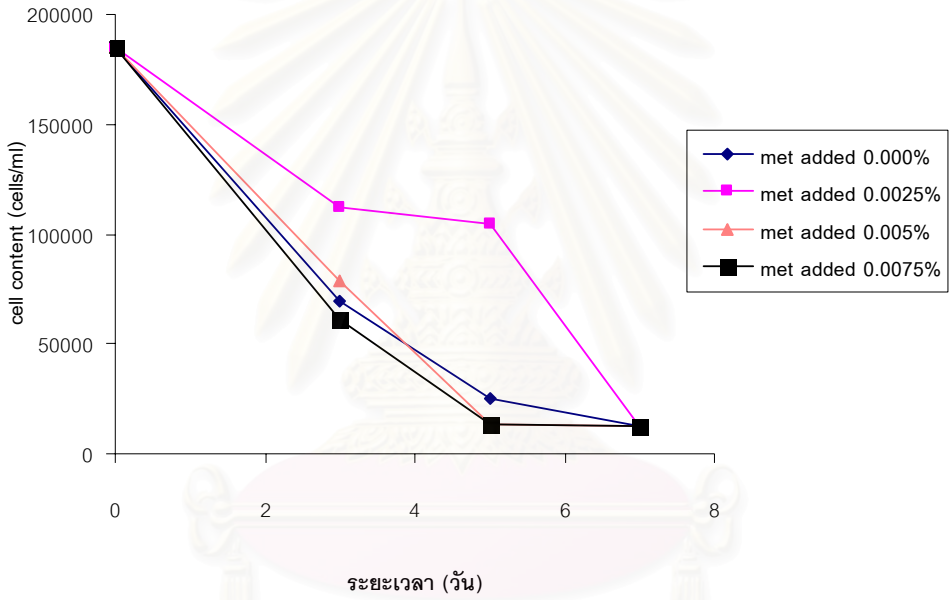


รูปที่ 31 จำนวนเซลล์ที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 37°ซ



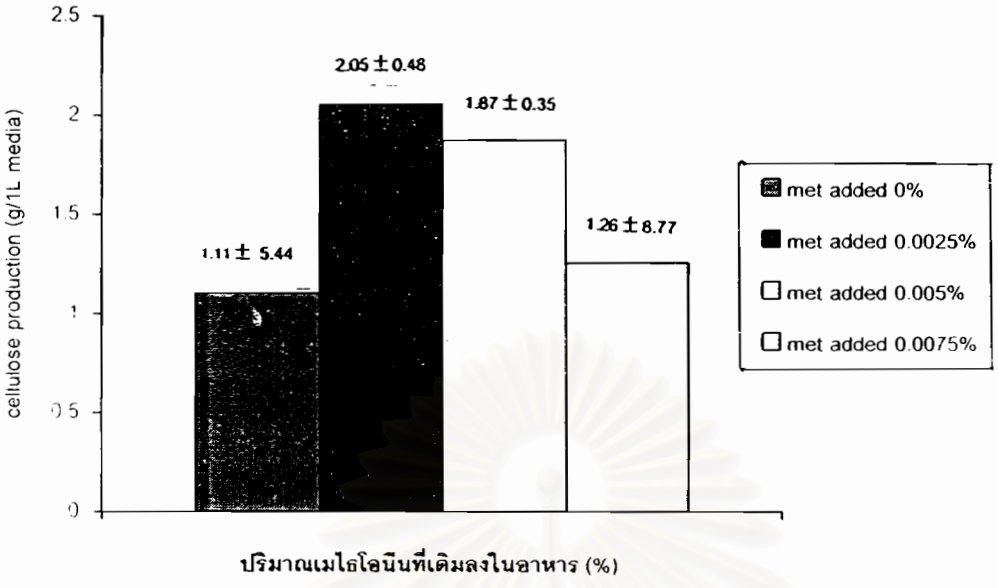
รูปที่ 32 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 37°ซ เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน

จากการทดลองที่ 40°ซ เมื่อพิจารณาจำนวนเซลล์ พบว่ามีจำนวนเซลล์ลดลง (รูปที่ 33) ในทุกระดับความเข้มข้นของเมไธโอนีนที่เติมลงไป เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่าง(pH)ลดลง ปริมาณกรด (acid content) เพิ่มขึ้น ทำให้สภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกรดสูง การสร้างเซลลูโลสลดลง และปริมาณการใช้น้ำตาลมีค่าเพิ่มสูงขึ้น ที่ความเข้มข้นของเมไธโอนีน 0.0025%(w/v) มีการใช้น้ำตาลมากที่สุดคือ 15.31 %(w/w) ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด 2.055 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 34) มากกว่าไม่เติมเมไธโอนีนในอาหาร 48.47% อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นเซลลูโลส 10.87 กรัม(กรัม/100 น้ำตาลที่ถูกใช้)ซึ่งสูงกว่าไม่เติมเมไธโอนีนในอาหาร 39.37% และให้ความหนาวุ้นสูงสุดคือ 4.16 มิลลิเมตร (รูปที่ 35)

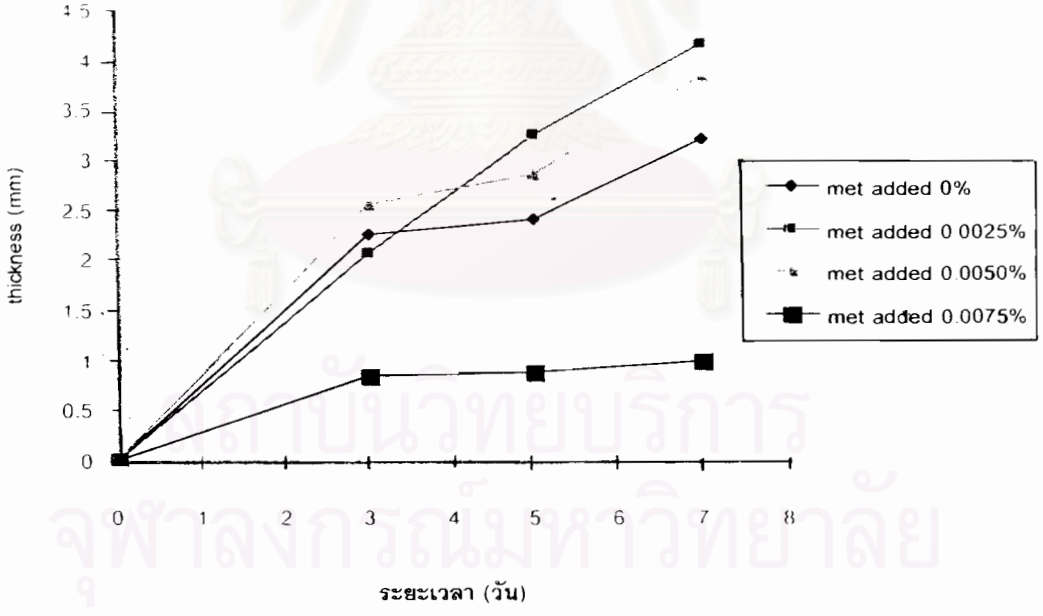


รูปที่ 33 จำนวนเซลล์ที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 40°ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

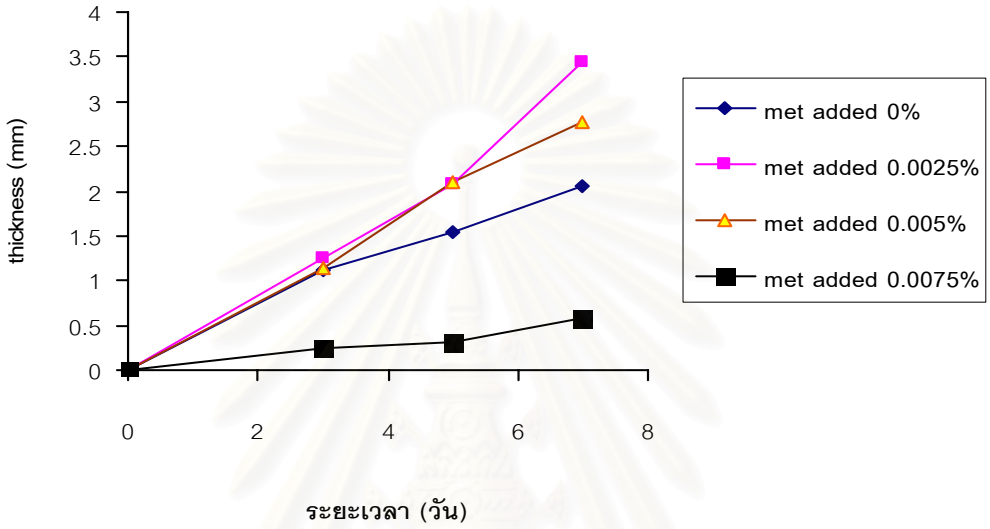


รูปที่ 34 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 40°ซ เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน



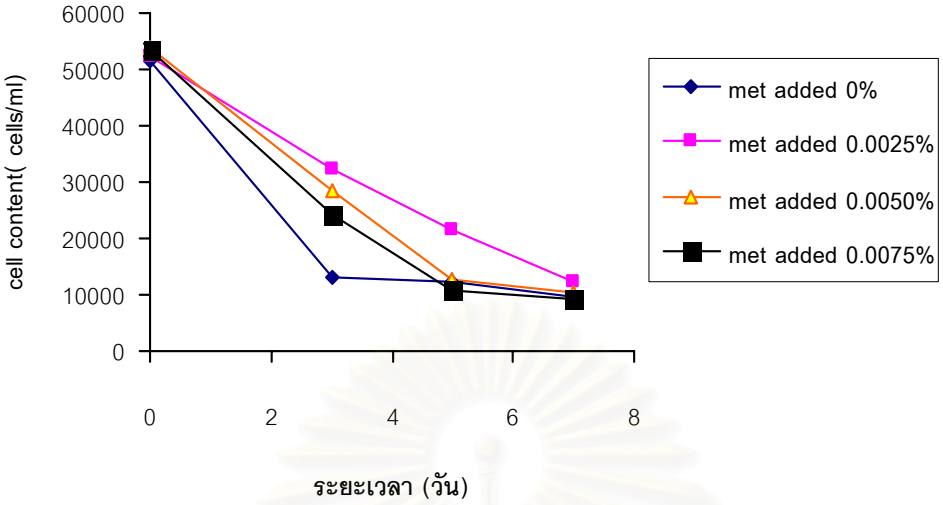
รูปที่ 35 ความหนาวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 40°ซ

ผลการทดลองที่ 42°ซ อาหารที่เติมเมไธโอนีน 0.0025%(w/v) มีความหนาของวุ้นสูงสุด 3.85 มิลลิเมตร (รูปที่ 36) อัตราการสร้างแผ่นวุ้น 0.23 มิลลิเมตรต่อวัน จำนวนเซลล์มีการลดลง ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ลดลงจาก 4.95 เป็น 4.01 และปริมาณกรด (acid content) เพิ่มขึ้นจาก 0.11% เป็น 0.16%(w/v) โดยมีการใช้น้ำตาลมากที่สุด 12.38%(w/w) ผลิตเซลลูโลสได้ 1.25 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 38)

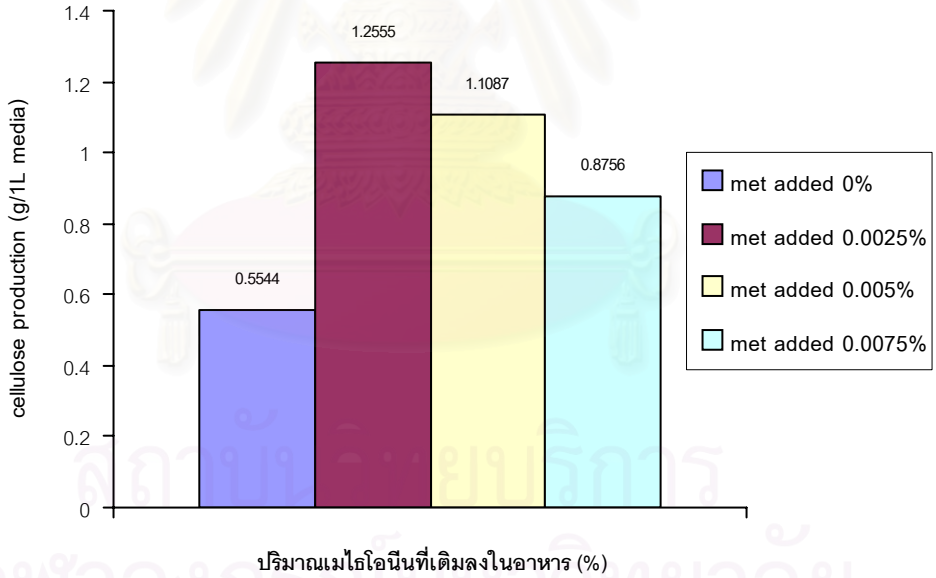


รูปที่ 36 ความหนาของวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิ 42°ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 37 จำนวนเซลล์ที่ผลิตโดย *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่างๆที่อุณหภูมิ 42°ซ



รูปที่ 38 ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมเมไธโอนีนในปริมาณต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 42°ซ เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน

การเติมเมไธโอนีน ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไปกระตุ้นให้อัตราการสร้างเซลลูโลสเพิ่มสูงขึ้นได้ ซึ่งจะเห็นได้จากปริมาณเซลลูโลสที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Matsuoka และคณะ(1996) ซึ่งได้ศึกษาผลของกรดอะมิโนต่อการผลิตเซลลูโลส โดยการเปรียบเทียบกับ CSL ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดเพราะพบว่า มีกรดอะมิโนหลายชนิดเป็นองค์ประกอบโดยใช้อาหารที่เติมเมไธโอนีนเพียงอย่างเดียว อาหารที่เติมกรดอะมิโน 14 ชนิด อาหารที่เติมกรดอะมิโน 14 ชนิด ยกเว้นเมไธโอนีนและอาหารที่ไม่เติมกรดอะมิโนเลย พบว่า ในอาหารที่มีเมไธโอนีนเพียงอย่างเดียวมีปริมาณเซลลูโลสใกล้เคียงกับอาหารที่มีกรดอะมิโนทั้ง 14 ชนิด และในอาหารที่ไม่มีเมไธโอนีนจะมีปริมาณเซลลูโลสที่ต่ำมาก ซึ่งปริมาณเมไธโอนีนที่ใช้ คือ 0.005% (w/v)ในการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลการเจริญของเชื้อและการผลิตเซลลูโลสดีที่สุด ส่วนในการทดลองนี้ พบว่าเกิดความไม่สอดคล้องสำหรับปริมาณเมไธโอนีนที่ใช้ เนื่องจากปัจจัยความแตกต่างในหลายๆด้าน เช่น ด้านอุณหภูมิ ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นอุณหภูมิที่เกินช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ ทำให้มีการใช้ปริมาณเมไธโอนีนในปริมาณที่แตกต่างจากการทดลองของ Matsuoka และคณะ(1996) เพื่อกระบวนการเมตาบอลิซึมซึ่งมีผลต่อการเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลส ปริมาณเมไธโอนีนที่เหมาะสมในระดับ 0.0075 %(w/v) สำหรับอุณหภูมิ 37 °ซ เชื้อเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้สูงสุด และพบว่าที่ความเข้มข้นเมไธโอนีน 0.0075%(w/v) สร้างเซลลูโลสที่มีความหนาน้อยมากที่อุณหภูมิ 40 °ซ และ 42 °ซ สันนิษฐานว่าอาจเนื่องมาจากการลดลงของเซลล์อย่างรวดเร็วและต่อเนื่องเป็นผลจากอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมและปริมาณกรดที่เชื้อสร้างขึ้นทำให้สภาวะนั้นไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อและไม่สามารถนำเมไธโอนีนมาใช้ในการเจริญของเซลล์ในช่วงเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อและการผลิตเซลลูโลสได้

4.4.4 ศึกษาผลของการทำงานร่วมกันของน้ำตาลซูโครส แลคเตทและเมไธโอนีนในปริมาณเหมาะสม ต่อการเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูง

เมื่อศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครส ปริมาณแลคเตท และเมไธโอนีนที่เหมาะสม ผลที่ได้จากการทดลองข้อ.4.4.1.4.4.2 และ 4.4.3 ร่วมกันในอาหารน้ำมะพร้าว การทดลองเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* G9 พบว่าในอาหารน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำตาลซูโครส 5% (w/v) ปริมาณแลคเตทเริ่มต้น 0.20%(v/v) และปริมาณเมไธโอนีนเริ่มต้น 0.005%(w/v) เชื้อเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้สูงสุด มากกว่าเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าว โดยที่อุณหภูมิ 37°ซ มีความหนาวุ้นสูงสุด 15.55 มิลลิเมตร ปริมาณเซลลูโลส 4.15 กรัมต่อลิตร อัตราการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเซลลูโลส 13.67 กรัม (กรัม/100 น้ำตาลที่ถูกใช้)ที่อุณหภูมิ 40°ซ มีความหนาวุ้นสูงสุด 8.56 มิลลิเมตร ปริมาณ

เซลลูโลส 3.51 กรัมต่อลิตร อัตราการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเซลลูโลส 12.35 กรัม (กรัม/100 น้ำตาลที่ถูกใช้) และที่ 42°ซ มีความหนาวุ้นสูงสุด 4.57 มิลลิเมตร ปริมาณเซลลูโลส 2.54 กรัมต่อลิตร

อัตราการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเซลลูโลส 12.01 กรัม (กรัม/100 น้ำตาลที่ถูกใช้) ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวในทุกระดับอุณหภูมิ ดังตารางที่ 10

ปริมาณซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมในอาหารน้ำมะพร้าว 8% (w/v)นั้น ได้จากการเติมซูโครสลงไป 5% (w/v) ซึ่งจากเดิมซึ่งมีอยู่แล้วในน้ำมะพร้าว 3.07% (w/v) ซึ่งทำให้มีจำนวนเซลล์สูงสุด ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ลดลง และปริมาณกรด (acid content) ที่เพิ่มขึ้น นั้นมีค่าต่ำสุด เชื้อใช้น้ำตาลในปริมาณมากที่สุดไปใช้ในการผลิตเซลลูโลส เนื่องจากปริมาณผลผลิตเซลลูโลสที่ได้มีค่าสูงสุด สอดคล้องกับการทดลองของ Alban ในปี 1962 ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ N-108 ในอาหารน้ำมะพร้าวที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนและทำการแปรปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เติมลงในอาหารน้ำมะพร้าวตั้งแต่ 0-10 % พบว่าเมื่อปริมาณซูโครสในอาหารสูงขึ้นแต่ไม่เกิน 8% แผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวที่ได้จะมีความหนาและน้ำหนักเปียกสูงขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-8% ซึ่งเชื้อจะสร้างแผ่นวุ้นที่หนาและเนื้อแน่น

ปริมาณแลคเตทเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* G9 คือ 0.20%(v/v) ให้ความหนาวุ้นสูงสุด รองลงมาคือมีการเติมแลคเตท 0.15%(v/v) 0.10% (v/v) และอาหารที่มีน้ำตาลเพียงอย่างเดียวให้ความหนาวุ้นต่ำสุด จำนวนเซลล์มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่ลดลง และปริมาณกรด (acid content) ที่เพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง ในการทดลองนี้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 2.5-3 เท่า ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Matsuoka และคณะ (1996) ซึ่งปริมาณแลคเตทเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 0.15%(v/v) เชื้อเจริญและผลิตเซลลูโลสสูงสุดเพิ่มจากเดิม 4-5 เท่า

ปริมาณเมไธโอนีนเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของ *Acetobacter* G9 คือ 0.005%(w/v) ให้ความหนาวุ้นสูงสุด จำนวนเซลล์มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่ลดลง และปริมาณกรด (acid content) ที่เพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด และการใช้ปริมาณน้ำตาลมีค่ามากที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของ Matsuoka และคณะ (1996) ซึ่งใช้เมไธโอนีน 0.005%(w/v) การเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อสูงสุด เพิ่มจากปรกติถึง 50%

ผลการเลี้ยงเชื้อ*Acetobacter*G9ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวเปรียบเทียบกับอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำตาลซูโครส 8%(w/v) แลคเตท 0.20%(v/v) และเมไธโอนีน 0.005% (w/v) ที่อุณหภูมิสูง 37 °ซ 40 °ซ และ 42 °ซ

characteristic	อาหารน้ำมะพร้าว			อาหารน้ำมะพร้าว+susrose 5%(w/v) +lactate0.20%(v/v)+methionine 0.005% (w/v)		
	37 °ซ	40 °ซ	42 °ซ	37 °ซ	40 °ซ	42 °ซ
Cellulose (g dried weigth/1L media)	1.378±1.75	1.059 ± 2.55	1.015±1.57	4.154±0.25	3.512±0.87	2.541±0.07
Cellulose production (g/100 g sugar consumption)	8.17±2.05	6.59 ± 3.55	7.15±0.98	13.67±1.07	12.35±3.55	12.01±3.45
Thickness (mm)	9.57±0.35	4.75±1.34	3.96±0.25	15.55±1.75	8.56±0.05	4.57±1.55

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จะเห็นได้ว่าเมื่อมีการร่วมกันของสารอาหารจะทำให้เชื้อสามารถสร้างแผ่นวุ้นที่หนาขึ้นได้ ในอาหารน้ำมะพร้าวที่มีสารทั้งสามชนิดอยู่นั้น ช่วยให้เชื้อ G9 สามารถสร้างแผ่นวุ้นได้หนาขึ้นและผลิตเซลลูโลสได้ดีขึ้น(Matsuoka และคณะ,1996) ทั้ง 3 ระดับอุณหภูมิคือ ที่ 37°ซ 40°ซ และ 42°ซ

4.5 การเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ในน้ำชา และหา fraction ที่แยกได้จากน้ำชาซึ่งมีผลต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* ที่อุณหภูมิสูง

วัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter xylinum* คือ น้ำมะพร้าวแก่ เนื่องจากเป็นวัตถุดิบเหลือใช้ และมีสารอาหารเหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ,2535 และ สมศรี สีปีพัฒนวิทย์,2531) จึงได้นำมาใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารในการศึกษาข้างต้น และในการทดลองนี้ ได้สนใจนำน้ำชามาใช้ในการเลี้ยง *Acetobacter xylinum* เพื่อศึกษาผลของการเจริญของเชื้อและการสร้างเซลลูโลส ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำชานั้นมีมากมาย ที่สำคัญหลักๆ และมีปริมาณมากคือ สารประกอบพวกโพลีฟีนอล คาร์โบไฮเดรท และโปรตีน(www.cpcrop.com/tea/tea02_var.htm)ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำชาเป็นองค์ประกอบ พบว่า เชื้อ *Acetobacter xylinum* G9 สามารถเจริญและสร้างวุ้นเซลลูโลสได้สูงกว่าในอาหารน้ำมะพร้าว เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูง 37°ซ และ 40°ซ ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* G9 ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวและในอาหารน้ำชา

สิ่งที่ศึกษา	อาหารน้ำมะพร้าว			อาหารน้ำชา[a]		
	37 °c	40 °c	42 °c	37 °c	40 °c	42 °c
thickness [mm]	15.10± 2.57	8.50±1.54	4.20±1.37	11.47±0.14	4.58±0.15	3.29±0.24
cellulose production (g dried weight/ 1L media)	2.017±0.27	1.468±0.15	1.025±0.24	2.753±0.15	2.077±0.03	1.254±0.07
sugar consumption (%)	35.29±2.74	29.27±2.87	24.37±2.59	42.65±2.17	35.28±2.05	29.45±1.42
Acid content (g acetic acid/100 ml)	0.285±0.02	0.247±0.05	0.259±0.04	0.174±0.10	0.253±0.07	0.284±0.15

a สูตรอาหารเตรียมเช่นเดียวกับอาหารน้ำมะพร้าวแต่เปลี่ยนน้ำมะพร้าวเป็นน้ำชา

4.5.1 แยกสารจากน้ำชาตามความแตกต่างของ Molecular weight เพื่อหา fraction ที่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* G9 ที่อุณหภูมิสูง

4.5.1 นำน้ำชามาแยกสารตามความแตกต่างของ Molecular weight โดยใช้เทคนิค Gel chromatography (Ansari.และ Mage,1977)และศึกษาผลของ fraction ต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลส

จากการทดลอง ทำการเก็บ fraction ได้ทั้งหมด 95 fraction เมื่อนำ 95 fraction ที่ได้มาทดสอบ โดยใส่ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium (Matsuoka และคณะ,1996) (ภาคผนวก ก)ในการทดลองใช้อาหาร Basal medium เนื่องจาก อาหารชนิดนี้ จะไปช่วยให้เชื้อสามารถดำรงอยู่ได้เท่านั้น แต่จะไม่เอื้อผลให้เชื้อสามารถสร้างหรือผลิตเซลลูโลสได้

ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี 95 fraction ที่แยกได้จากน้ำชาร่วมอยู่ด้วย พบว่า fraction ที่ 40 42 45 46 53 54 55 และ 56 มีผลต่อการเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อ fraction ที่ 53 มีผลต่อการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อสูงสุด และยังพบว่าการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 40 และ 42° ซ นั้น fraction ที่ 53 ดังกล่าวข้างต้นมีผลต่อการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* G9 ที่ทดสอบในอาหาร Basal medium ที่ใส่ร่วมกับ 95 fraction ที่แยกได้จากน้ำชา ให้ผลไปในแนวทางเดียวกัน คือ เมื่อเชื้อสามารถเจริญได้ดี ปริมาณเชื้อในอาหารเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสได้มากขึ้น

4.5.2 ศึกษาผลของ fraction ที่คัดเลือกได้(จากข้อ 4.5.1) ต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว(อังคณา พันธ์ศรี, 2541)

fraction ที่ 53 ที่คัดเลือกได้ว่ามีผลต่อการเจริญ และเชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสได้หนาที่สุด เมื่อนำมาทดสอบเปรียบเทียบกับอาหารสูตรน้ำมะพร้าวให้ผลดังตารางที่ 12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* G9 ในอาหารน้ำมะพร้าวและในอาหารน้ำมะพร้าวร่วมด้วย fraction ที่ 53 ที่แยกได้จากน้ำชา

สิ่งที่ศึกษา	อาหารน้ำมะพร้าว			อาหารน้ำมะพร้าว + fraction ที่ 53[b]		
	37 °c	40 °c	42 °c	37 °c	40 °c	42 °c
thickness [mm]	12.14± 2.64	8.50±2.79	3.92±3.35	16.27±0.04	10.25±0.11	4.55±0.01
cellulose production (g dried weight/ 1L media)	2.017±0.27	1.455±0.15	1.025±0.24	2.554±0.12	1.975±0.02	1.375±0.15
Cell content (cells/ ml)	3.55×10^5	7.15×10^4	1.25×10^4	1.15×10^6	4.45×10^5	4.25×10^4

b ปริมาณที่ใช้ร่วมกับอาหารน้ำมะพร้าวในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร

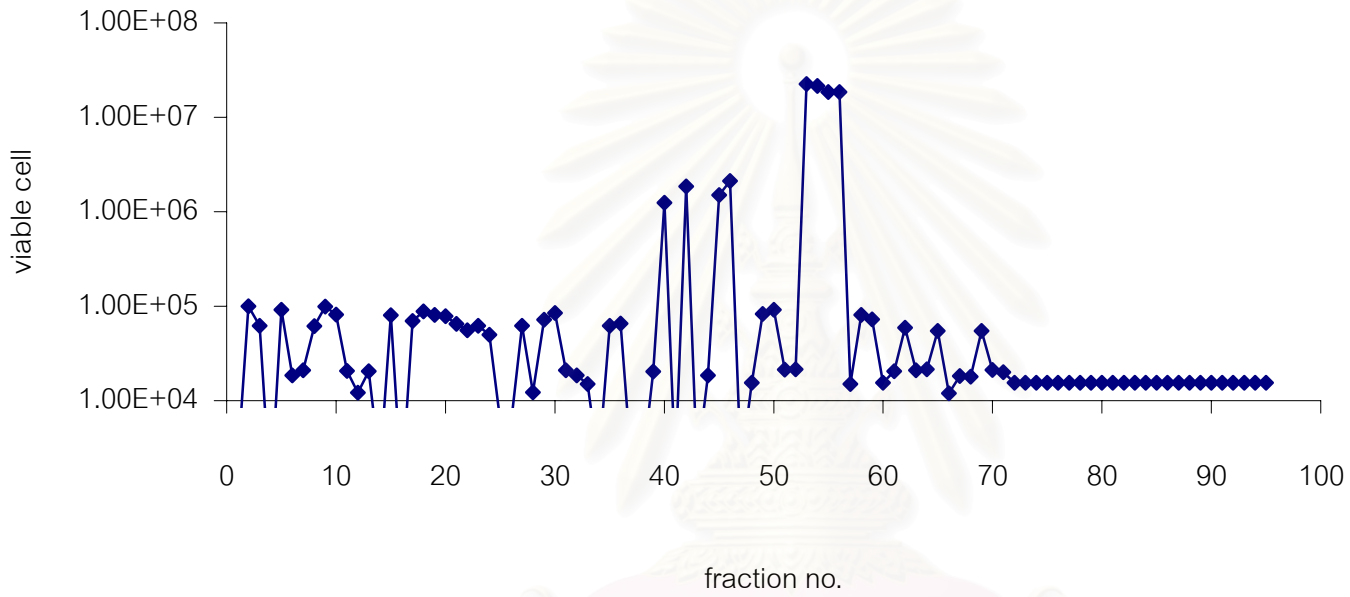
จากผลการทดลองที่ 37 °ซ การเลี้ยง *Acetobacter xylinum* G9 ในอาหารน้ำมะพร้าวที่มี fraction ที่ 53 ที่แยกได้จากน้ำชาร่วมอยู่ด้วย พบว่า การเจริญของเชื้อเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และปริมาณเซลล์ในวันสุดท้ายของการทดลองคือวันที่ 7 อยู่ที่ 1.15×10^6 CFU/ml ซึ่งมีปริมาณมากกว่าในการเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวซึ่งมีเพียง 3.55×10^5 CFU/ml ถึง 3.24 เท่า ในขณะที่ ปริมาณเซลลูโลสและความหนาของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่เลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวนั้นมากกว่าผลที่เลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่มี fraction no 53 จากชาอยู่ด้วย ถึง 1.267 และ 1.34 เท่า ตามลำดับ

ผลการทดลองที่ 40 °ซ พบว่า การเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้น 6.22 เท่า เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวร่วมกับ fraction ที่ 53 ที่แยกได้จากชา และปริมาณเซลลูโลสและความหนาของแผ่นวุ้นเซลลูโลสนั้นเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน โดยมากกว่าที่เลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวถึง 1.35 และ 1.205 เท่าตามลำดับ

ผลการทดลองที่ 42 °ซ พบว่า การเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวร่วมกับ fraction ที่ 53 ที่แยกได้จากชา นั้นสูงกว่าในอาหารน้ำมะพร้าว 3.4 เท่า ในขณะที่ปริมาณเซลลูโลสและความหนาของแผ่นวุ้นเซลลูโลสสูงกว่า 1.34 และ 1.16 เท่า ตามลำดับ

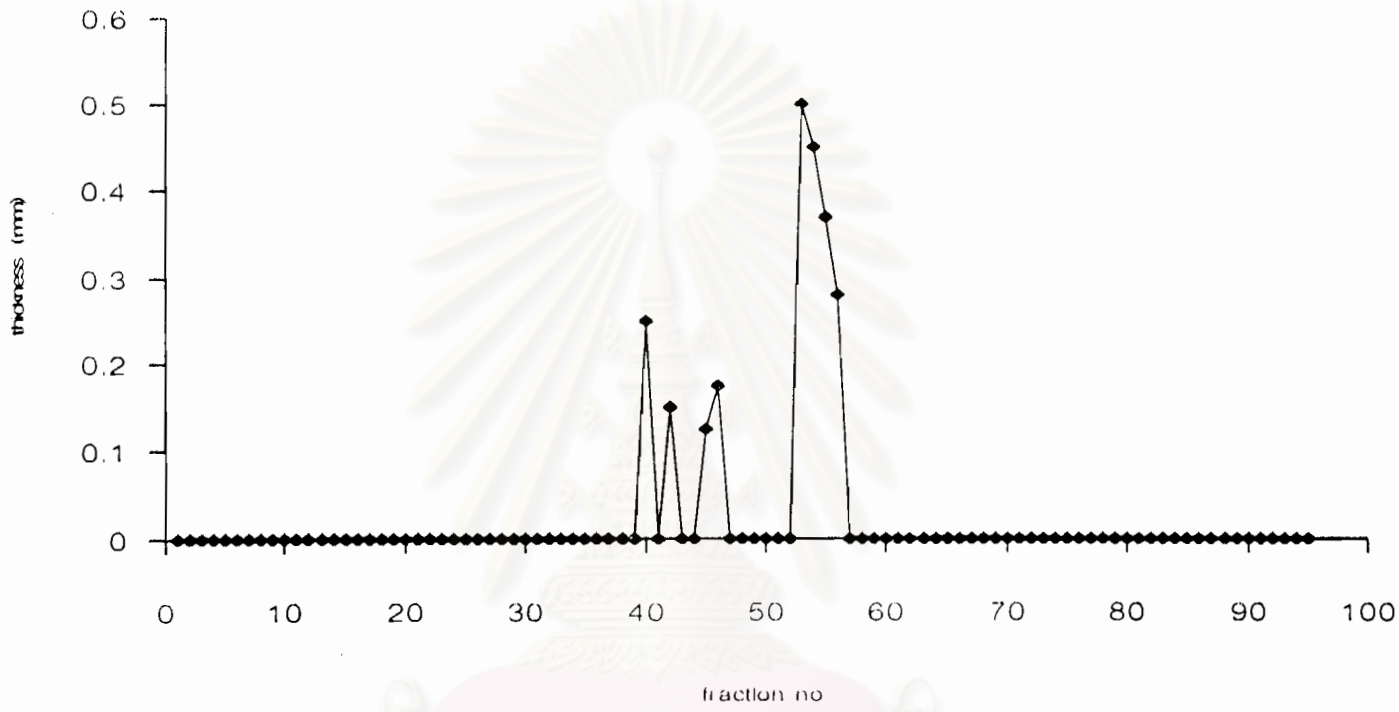
จากการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า เมื่อมี fraction ที่ 53 ที่แยกได้จากชา ร่วมกับอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่ใช้โดยปกติ มีผลต่อการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °ซ มากที่สุด รองลงมาคือที่ 42 °ซ และ 37 °ซ ตามลำดับ ในขณะที่มีผลต่อการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* G9 ที่ 40 °ซ มากที่สุด รองลงมาคือที่ 42 °ซ และ 37 °ซ ส่วนผลที่มีต่อความหนาของแผ่นวุ้นพบว่ามีผลที่ระดับอุณหภูมิ 37 °ซ มากที่สุด รองลงมาคือ 40 °ซ และ 42 °ซ ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 39 จำนวนเซลล์ *Acetobacter xylinum G9* ในอาหาร basal medium+ fraction ที่ได้จากการแยกสารจากน้ำชาด้วยเทคนิค Gel filtration chromatography

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



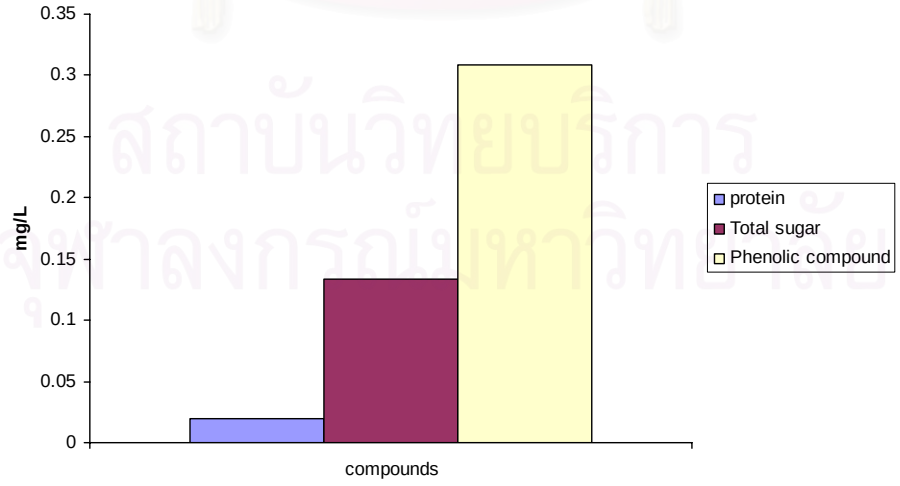
รูปที่ 40 แสดงผลความหนาแผ่นวุ้นเมื่อเลี้ยง *Acetobacter xylinum* G9 ในอาหาร Basal medium + fraction **ที่ได้จากการแยกสารในน้ำขาด้วยเทคนิค** Gel filtration chromatography

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5.3 ศึกษาองค์ประกอบของ fraction ที่ 53 ที่แยกได้จากน้ำชา ซึ่งมีผลทำให้การเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* G9 เพิ่มสูงขึ้น

จากการทดลองดังกล่าวข้างต้นพบว่า เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวเปรียบเทียบกับในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่มี fraction ที่ 53 ที่แยกได้จากน้ำชาร่วมด้วยนั้น ให้ผลการผลิตเซลลูโลสที่สูงขึ้น ปริมาณเซลล์ก็เพิ่มสูงขึ้นและความหนาวุ้นที่ผลิตได้ก็สูงขึ้นด้วยเช่นกัน จึงมีความสนใจว่า ใน fraction ที่ 53 ที่เอื้อให้เชื้อสามารถเจริญและให้ผลผลิตสูงขึ้นนั้น มีสารสำคัญเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณมากน้อยเพียงไร ซึ่งจากที่มีการศึกษามาแล้ว พบว่า องค์ประกอบของชาส่วนใหญ่ นั้น เป็นสารประเภท โพลีฟีนอล คาร์โบไฮเดรท ประเภทน้ำตาลในรูปโพลีแซคคาไรด์ และโปรตีน ซึ่งในการทดลองนี้ ได้ทำการศึกษาปริมาณสารดังกล่าวข้างต้นที่มีอยู่ใน fraction ที่ 53 ที่นำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการเลี้ยงเชื้อ และการสร้างผลผลิตของเชื้อที่อุณหภูมิสูง โดยทำการศึกษาวิเคราะห์ ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ,1951) (ภาคผนวก ข) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Dubois และคณะ,1956)(ภาคผนวก ข) และ phenolic compound ในรูปของ gallic acid (ภาคผนวก ข)

ผลการทดลองที่ได้พบว่า ใน fraction ที่ 53 มีปริมาณโปรตีนทั้งสิ้น 0.019 $\pm$0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด(Total sugar) และ phenolic compound ในรูปของ gallic acid ทั้งสิ้น 0.134 $\pm$0.014 และ 0.308 $\pm$0.009 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 41



รูปที่ 41 ปริมาณสารองค์ประกอบของ fraction ที่. 53 ที่แยกได้จากน้ำชา

ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับข้อมูลจาก www.cpcrop.com/tea/tea02_var.htm คือ ในน้ำชาจะมีปริมาณขององค์ประกอบที่เป็น Total polyphenol อยู่สูงสุด รองลงมาคือ น้ำตาลซึ่งอยู่ในรูป polysaccharide และโปรตีนซึ่งอยู่ในรูปของกรดอะมิโน ตามลำดับ ซึ่งจากข้อมูลที่ได้สามารถสรุปได้ว่า เชื้อ *Acetobacter xylinum* G9 ซึ่งเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวซึ่งมี fraction ที่ 53 ที่แยกได้จากน้ำชาใช้สารอาหารประเภทดังกล่าวเพิ่มขึ้นจากในอาหารน้ำมะพร้าว เป็นผลให้การเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิสูงดีขึ้นและสามารถผลิตเซลลูโลสได้ในปริมาณสูงขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

คัดแยกเชื้อที่สามารถสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูง จากผลไม้สุกงอมจากตลาดต่างๆในกรุงเทพมหานคร ได้เชื้อที่สามารถเจริญและผลิตแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิสูง ทั้ง 3 ระดับ คือ 37°ซ 40°ซ และ 42 °ซ ได้แก่ G9 G11 G16 R9 และ R9/2 เมื่อทดสอบลักษณะทางชีวเคมี เทียบกับเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR893 ร่วมกับผลการตรวจสอบ 16s rDNA ยืนยันได้ว่าทั้ง 5 เชื้อที่คัดแยกได้เป็น *Acetobacter xylinum* และพบว่าที่ 37 °ซ และ 40°ซ *Acetobacter xylinum* G9 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ และที่ 42 °ซ สามารถเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาปัจจัยของสารอินทรีย์ต่างๆที่เกี่ยวข้องพบว่า ในอาหารน้ำมะพร้าวที่มีปริมาณน้ำตาล 8%(w/w) ให้ปริมาณผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด ทั้ง 3 ระดับอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง เมื่อเติมแลคเตท ปริมาณ 0.15%(v/v) ในอาหารน้ำมะพร้าวที่ใช้เพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum* G9 ได้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด ที่อุณหภูมิ 37 °ซ และ 40°ซ และปริมาณแลคเตท 0.20 %(v/v) ได้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด ที่ 42 °ซ เมื่อแปรปริมาณเมไธโอนีนในอาหารน้ำมะพร้าว พบว่า ที่ความเข้มข้นของเมไธโอนีน 0.0075 %(w/v) *Acetobacter xylinum* G9 ให้ปริมาณผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด ที่อุณหภูมิ 37 °ซ และ ปริมาณเมไธโอนีน 0.0025 %(w/v) ให้ปริมาณผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด ที่ 40 °ซ และ 42 °ซ ในขณะที่เมื่อทำการทดลองการใส่สารอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดร่วมกันในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว พบว่า อาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่มีน้ำตาล 8%(w/w) แลคเตท 0.2%(v/v) และ เมไธโอนีน 0.005 %(w/v) *Acetobacter xylinum* G9 สามารถเจริญและให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด และเมื่อนำ *Acetobacter xylinum* G9 มาเลี้ยงในอาหารน้ำชา พบว่า ให้ผลผลิตสูงกว่าเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าว และเมื่อแยกสารตามความแตกต่างของ Molecular weight จากน้ำชา โดยใช้เทคนิค Gel chromatography แล้วได้ fraction ทั้งหมด 95 fraction ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อคือ fraction ที่ 40 42 45 46 53 54 55 และ 56 ในขณะที่ fraction ที่ให้ผลดีที่สุดสำหรับการเจริญและผลิตเซลลูโลสคือ fraction ที่ 53 ซึ่งมีสารประกอบฟีนอลิก ในรูปของ gallic acid ทั้งสิ้น 0.308 ปริมาณโปรตีน 0.019 และ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 0.134 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดลองทำการแยกเชื้อจากผลไม้หลากหลายแหล่ง ทั้งในเขตกรุงเทพมหานคร และต่างจังหวัด เนื่องจากสภาวะแวดล้อมอาจมีผลให้เชื้อเจริญได้ต่างกัน
2. ควรศึกษาผลของสารที่แยกได้จากน้ำชา ร่วมกับสารส่งเสริมการสร้างเซลลูโลส เช่น เพิ่มแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ
3. ควรทำการทดสอบองค์ประกอบของสารที่มีใน fraction ที่แยกได้จากน้ำชา ในทุก fraction ที่แยกได้ เปรียบเทียบสารที่พบ และผลที่มีต่อการเจริญและสร้างเซลลูโลสของเชื้อ
4. ควรนำ fraction ที่มีผลต่อการเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* ไปทดสอบกับเชื้อตัวอื่นๆ เพื่อศึกษาว่าสามารถเพิ่มการเจริญของเชื้อและการสร้างแผ่นวุ้น เซลลูโลสหรือไม่
5. ควรศึกษาผลการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อที่อุณหภูมิสูงโดยนำ fraction ทั้งหมดคือ 40 42 45 46 53 54 55 และ 56 มาทดสอบรวมกัน เพื่อศึกษาว่าสามารถส่งเสริมให้เชื้อเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูงได้มากขึ้นหรือไม่
6. ทดสอบการเจริญของเชื้อร่วมกับ fraction ที่มีผลต่อการเจริญและสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่แยกได้จากน้ำชา ที่ระดับอุณหภูมิสูงกว่า 42 ^{o}ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ธัญญารัตน์ พงศ์พรางกูร. 2541 ผลของภาวะการณ์เลี้ยง *Acetobacter* สายพันธุ์ Agr60 และ TISTR 975 ต่อสมบัติทางกายภาพของแผ่นวุ้นเซลลูโลส. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภา โล่ห์ทอง. 2520. น้ำส้มสายชู. ข่าวสารเกษตรศาสตร์. 21(4) : 70-75.

วราวุฒิ ครูส่ง, นฤมล ชูวัฒนะเดช, เชิดชัย ตั้งอมรสุขสันต์ และ อินทิรา ปรุงเลิศบัวทอง. 2535. การผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าว. วารสารเกษตรศาสตร์พระจอมเกล้า 10(4) : 46-60.

วราวุฒิ ครูส่ง, กรวิกา สุขศรีวงษ์ และปนัดดา พวงเกษม. 2536. การผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* ในน้ำหางนม. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง 11(1) : 47-54.

สมคิด ธรรมรัตน์. 2531. การผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวและการแปรรูป. อาหาร. 18(4) : 250-262.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2526. อะซิติกแอซิดแบคทีเรีย. เอกสารประกอบการสอน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมศรี ลิมปิพัฒนวิทย์. 2531. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับทำวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าวแก่. อาหาร 18(4) : 239-249.

อังคณา พันธ์ศรี. 2541. ผลของออกซิเจนและสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

AOAC. 1990. Official Method of Analysis Vol 2, 15th ed. Association of Official Analytical Chemist.

Alban, A.C. 1962. Studies on the optimum conditions for Nata De Coco bacterium or Nata formation in coconut water. The Philippine Agriculturerist 45 : 490-496.

Akira, S.,Kojima,Y.,Tonouchi,N.,Tsuchida,T., and Yoshinaka, F.1997. Screening of bacterial cellulose producing *Acetobacter* strains suitable for sucrose as a carbon source. Biosci. Biotech. Biochem. 61(4):138-145.

Ansari AA, Mage RG.1977. Molecular-weight estimation of proteins using sepharose CL-6B in guanidine hydrochloride. J Chromatogr. 140(1):98-102

Ammemura, A., Hashimoto, T., Koizumi, K. and Utamura, T. 1985. Occurrence of extracellular (1→2) - β-D-gluco-oligosaccharides in *Acetobacter*. J. of Gen. Microbiol. 131:301-307.

Asai, T., Lizuka, H. and Komagata, K. 1964. The flagellation and taxonomy of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter* with reference to the existence of intermediate strains. J. Gen. Appl. Microbiol. 10(2): 95-126.

Asai, T. 1968. Acetic Acid Bacteria Classification and Biochemistry Activities. Tokyo : Tokyo Press.

Breed, R.S., Murray, E.G.D., and Smith, N.R. 1957. Burgey's Mannual of Determinative Bacteriology. 7th ed. Baltimore : Williams and Wilkins.

Brown, R.M.,Jr., Willison, J.H.M., and Richardson, C.L. 1976. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum* : Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73 (12) : 4565-4569.

Brown, R.M. 2002. Microbial cellulose : A new resorce for wood, paper, textiles, food, and specialty products. Position Paper [on line] Available from: http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/position1.html [July 8, 2002]

Budniono, A. 1999. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. Carbohydrate Polymer 40 : 137-143.

Carigliano, M.C. 1982. A selective medium for the isolation and differentiation of *Gluconobacter* and *Acetobacter*. J. of Food Sci. 47:1038-1039.

Chao, Y., Ishida, T., Suano, Y., and Shoda, M.2000. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50 L internal loop airlift reactor. Biotechnology and Bioengineering 68 (3): 345-352.

Coeffy ,D.G., and Bell , D.A. 1995. Cellulose and cellulose derivatives cited in Stephen, A. M. 1995. Food Polysaccharide and their application. New York : Dekker.

Colvin, J.R., Chene, L., Sowdeu, L.C. and Takai, M. 1977. Purification and properties of a soluble polymer of glucose from cultures of *Acetobacter xylinum*. Can. J. Biochem. 55:1057-1063.

De Ley, J. and Fratuer, J. 1974. The genus *Gluconobacter* and the genus *Acetobacter*. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.8th ed.,by R.E.Buchanan and N.E.Gibbos, The Willams and Wilkins Co.,Baltimore.

De Ley, J.,Gillis,M.and Swings, J.1984. Acetobacteriaceae. In Bergey's Manual of systematic bacteriology. Vol.1.ed.,by Krieg, N.R., The Willams and Wilkins Co.,Baltimore.

Dimaguila, L.A. 1976. The Nata de coco 2. Chemical nature and properties of Nata. The Philippine Agriculturerist 40 : 475-485.

Dubois, M. 1956. Colormetric method for determination of sugars and related substance. Analytical Chemistry 28: 350-356.

Dudman, W.F. 1959. Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* in define medium. Journal of General Microbiology 21: 327-337.

Dudman, W.F. 1960. Cellulose production by *Acetobacter* strains in submerged culture. Journal of General Microbiology 22: 25-30.

Entani, E., Ohmori, S.,Masai,H. and Suzuki, K. 1985. *Acetobacter polyoxygens* sp. Mov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. J. Gen. Appl. Microbiol. 31:475-490.

Fontana, J.D., Franco, V.C., De Souza, S.J., Lyra, I.N. and De Souza A.M.1991. Nature of plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* ("tea fungus") biofilm used in skin therapy. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28, 341-351.

Furda, I. 1977. Fractionation and Examination of Biopolymer from Dietary Fiber. Cereal Foods World 22(6): 252-254.

Gillis,M., Kersters, K., Hoste, B. Janssens, D., Kroppenstedt,R.M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S., Dobereiner, J. and De Lay, J.1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. Nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. Int. J. Syt. Bacteriol. P.361-364.

Gossele, F., Swings, J., Kersters, K., andDe Ley,J. 1983.Numerical analysis of phenotypic features and protein gel electropherograms of *Gluconobacter* Asai 1935 emend. Mut. Char. Asai, Iizuka, and Komagata 1964. Int. J. Syst. Bacteriol 33:65-81.

Gossele, J., and Swings, J. 1985. Identification of a nata-producing bacterium as *Acetobacter hansenii*. The Philippine journal of Science 114(3-4): 179-182

Guzman, M.P.,Alabrastro, E.F., and Tinsay, C.B. 1982. A submerged process for the production of Nata. NRCP Research Bull 37(7): 1-50.

Harada, T.1973. Nutrition of *Acetobacter rancens* S3 and F11 isolated from tanks for vinegar production. Agri. Biol. Chem. 37(1) : 139-144.

Hirai, A., and Horii, F. 1999. Cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum.* ICR Annual Report 6 : 28-29.

Hucker R, G.J. & H.J. Conn. 1923. Methods of Gram Staining. N.Y. State Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. No. 93.

Jonas, R., and Farah, L.F. 1998. Production and application of microbial cellulose. Polymer Degradation and Stability 59 : 101-106.

Jesus, E.G.D., Andres, R.M. and Magno, E.T. 1971. A study on the isolation and screening of microorganisms for production of diverse-textured NATA. The Philipine Journal of Science 100(1) : 41-53.

Komagata, K, Tanasupawat, S, Hashimoto, Y, Ezaki, T., and Kozaki, M, 1975. Staphylococcus capitis subsp. capitis Kloos and Schleifer 1975AL. Int J Syst Bacteriol 25, 62-79

Krystynowicz, A., Czaja, W., Jezierrska, A.W., Miskiewicz, M.G., Turkiewicz, M., and Bielecki, S. 2002. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 29 : 189-195.

Lapuz, M.M., Gallardo, E.G., and Palo, M.A. 1967. The Nata organism-culture requirements characteristic and identity. The Philippine Journal of Science 96 : 91-109.

Lucca, P.A., and Tepper, B.J. 1994. Fat replacer and the functionality of fat in foods. Trends in Food Science and Technology 5 : 12-19.

Lund, E.D. ,and Smoot, J. M. 1982. Dietary fiber content of some tropical fruit and vegetables. Journal of Agriculture and Food Chemistry 30 : 1123-1127.

Masaoka, S.,Ohe, T. ,and Sakota, N. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum* .Journal of Fermentation and Bioengineering 75 (1) : 18-22.

Mason, L.M. and Claus, G.W. 1989. Phenotypic characteristics correlated with deoxyribonucleic acid sequence similarities for three species of *Gluconobacter: G. oxydans* (Hanneberg 1987) De Lay 1961, *G. frateurii* sp. Nov., and *G. asaii* sp. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol 39:174-184.

Matsuoka, S., Tsuchida, T., Matsuchita, K., Adachi, O., and Yoshinaka, F,. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. Sucrofermentans. Biosci. Biotech. Biochem 60(4): 575-579.

Matsushita, K., Toyama, H., and Adachi, O. 1994. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. Advance Microbiology and Physiology 36 : 247-301.

Mayser P, Fromme S, Leitzmann C, Grunder K. The yeast spectrum of the "tea fungus Kombucha.' *Mycose* 1995; 38:289-295.

Minakami, H., Entani, E., Tayama, K., Fujiyama, S. and Masai, H. 1984. Isolation and characterization of a new polysaccharide producing *Acetobacter* sp. Agric. Biol.Chem 48(1) : 2405-2414.

Moonmangmee, S., Toyama, H., Adachi, O., Theeragool ,G., Lotong ,N. and Matsushit, K.2002. Purification and characterization of a novel polysaccharide involved in the pellicle produced by a thermotolerant *Acetobacter* strain. Biosci Biotechnol Biochem 66(4):777-783.

Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H. , and Yoshinaga, F. 1998. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. Journal of Fermentation and Bioengineering 85(1) : 89-95.

Nishi, Y., Uryu, M., Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., and Mitsuhachi, S. 1990. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. Part 2 Improvement of the chemical properties of sheets and their applicability to diaphragms of electroacoustic transducers. Journal of Materials Science 25:2997-3001.

Ohmori, S., Masai, H., Arima, K. and Beppu, T. 1980. Isolation and identification of acetic acid bacteria for submerged acetic acid fermentation at high temperature. Agric. Biol. Chem 44(12):2901-2906.

Oikawa, T., Kamatani, T., Kaimura, T., Ameyama, A., and Soda, K. 1995. Endo-β-glucanase from *Acetobacter xylinum* : purification and characterization. Current Microbiology 34 : 309-313.

Okiyama, A., Motoki, M., and Yamanka, S. 1987. the application of bacterial cellulose to processed food. The world congress of food science and technology. Souvenir Programme, 28 Sept-8 oct. Singapore Institute of Food Sci and technology.

Okiyama, A., Motoki, M., and Yamanka, S. 1992. Bacterial cellulose II. Processing of the gelatinous cellulose for food materials. Food Hydrocolloids 6(5):479-487.

Okiyama, A., Shirae, H., Kano, H.,and Yamanaka, S. 1992. Bacterial cellulose I .Two stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*. Food Hydrocolloid 6 (5) : 471-477.

Roberts, E.M., Saxena, I. M., and Brown, R.M. 1989. Biosynthesis of cellulose II in *Acetobacter xylinum*. cited in Schuerch, C. (editor). Cellulose and Wood Chemistry and Technology. New York : John Willey & Sons.

Ross, P., Mayer. R., and Benziman, M. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Journal of Microbiological Reviews 55(1):35-38.

Ruben, G.C., and Bokelman, G.H. 1987. Triple standed, left-hand-twisted cellulose microfibril. Crab. Res. 160:434-443.cited in legg,R.L.1990. Microbial cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum* Journal of General Microbiology.11:123-129.

Schramm, M., and Hestrin, S. 1954. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. Journal of General Microbiology.3:123-129.

Scragg, A.H. 1991. Bioreactors in Biotechnology : A practical approach. New York : Ellis Horwood.

Saeki,A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lothong, N. and Adachi, O. 1997. Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperature. Biosci. Biotech. Biochem 61(1):138-145.

Somporn Moonmangmee, Hirohide Toyama, Osao Adachi and others.,2002. Purification and Characterization of a Novel Polysaccharide Involved in the Pellicle Produced by a Thermotolerant Acetobacter Strain. Biosci.Biotechnol.Biochem 66(4):777-783.

Shibazaki, H., Kugo, S., Onabe, F., and Usuda, M. 1993. Bacterial cellulose as separation medium. Journal of Applied Polymer Science 50: 965-969.

Stanbury, P.F., and Whitaker, A. 1995. Principle of Fermentation Technology. Oxford:Pergamon Press.

Steiger, K.E. and Steinegger, E. 1957. On the tea fungus. Pharmaceutica Acta Helvetiae 32(4) 88-93.

Swings, J., De Lay, J. and Gillis, M. 1984. Pseudomonadaceae. In Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. ed. By Krieg, N.R., The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Takaaki, N., Tohru, K., Hisato, Y and Fumihiro, Y. 1998. Effect of Lactate on Bacterial Cellulose Production from Fructose in Continuous Culture. J. Fermentations and Bioengineering 85:89-95.

Tammarate, P. 1999. Process for modification and utilization of bacterial cellulose. US Patent no. 5,962,676.

Tayama, K., Minakami, H., Entani, E., Fujiyama, S. and Masai, H. 1985. Structure of and acedic polysaccharide from Acetobacter sp. NBI 1022. Agric. Biol. Chem. 49(4):959-966.

Thompson, N.S., Carlson, J.A., Kaustinen, H.M., and Uhlin, K.L. 1988. Int.J.Biol.Macromol. 10: 127.cited in White , D.G., and Brown, R.M., Jr. 1989. Prospects for the commercialization of the biosynthesis of microbial cellulose. InC. Schuerch(ed.), Cellulose and wood chemistry and technology, pp. 573-590. New York: John Wiley&Sons.

Toda, M., S. Okubo, H. Ikigai, T. Suzuki, Y. Suzuki, and T. Shimamura. The protective activity of tea against infections by *Vibrio cholerae* 01. Journal of Applied Bacteriology, 70 109-112 (1991).

Tonouchi, N., Horinouchi, S., Tsuchida, T., and Yoshinaga, F. 1998. Increase cellulose production from sucrose by *Acetobacter* after introducing the sucrose phosphorylase gene. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 62 (9): 1778-1780.

Tonouchi, N., Tahara, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T., and Horinouchi, S. 1998. Addition of small amount of an endoglucanase enhances cellulose production by *Acetobacter xylinum*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 59 (5): 805-808.

Townsley, P.M. 1998. Method for the producing cellulosic fibers and microcrystalline cellulose. US Patent no. 4,745,058.

Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Tsuchida, T., and Yoshinaga, F. 1995. Screening of bacterial cellulose-producing strains suitable for agitated culture. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 59 (8): 1498-1502.

Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K. and Komagata, K. 1989. *Acidomonas methanolica* comb. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol 39(1) :50-55.

Valla, S. and Kjosbakken, J. 1981. Isolation and characterization of a new extracellular polysaccharide from a cellulose negative strain of *Acetobacter xylinum.* Canadian J. Microbiol 27:599-603.

Valla, S. 1995. Food Biotechnology : Microorganism for cellulose production. New York : VCH Publisher Inc.

Watanabe, K. , and Yamanaka, S. 1995. Effect of oxygen in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture conditions. Bioscience Biotechnology Biochemistry 59 (1) : 65-68.

White, D. G., and Brown, R.M. 1989. Prospect for commercialization of the biosynthesis of microbial cellulose . cited in Schuerch, C. (editor). Cellulose and Wood Chemistry and Technology. New York : John Willey & Sons.

White, D. 1995. The Physiology and Biochemistry of Procaryotes. 2nd edition. Oxford University Press : New York.

Whitfield, C. 1998. Bacterial extracellular polysaccharide of bacteria. Bacteriology Review 22: 46-73.

Yamada, Y., Aida, K. and Uuemura, T. 1968. Distribution of ubiquinone 10 and 9 in acetic acid bacteria and its relation to the classification of genera *Gluconobacter* and *Acetobacer*, espectially of so-called intermediate strains. Agri. Biol. Chem 32(6) : 786-788.

Yamada, Y., Aida, K. and Uuemura, T. 1969. Ubiquinone of acetic acid bacteria and its relation to classification of genera *Gluconobacter* and *Acetobacer*, espectially of so-called intermediate strains. J.Gen.Appl. Microbiol 15:181-196.

Yamada, Y.,Nakazawa, E, Nozaki,A.and Kondo, K. 1976. Characterization of *Acetobacer xylinum* by ubiquinone system. J.Gen.Appl. Microbiol 22:285-292.

Yamada, Y.,Okada, Y.and Kondo, K. 1976. Isolation and Characterization of polarly flagellated intermediate strains in acetic acid bacteria. J.Gen.Appl. Microbiol 22:237-245.

Yamada, Y.1983. *Acetobacer xylinum sp.* Nov., rev., for the cellulose-forming and cellulose-less, acetate-oxidizing acetic acid bacteria with the Q-10 system. J.Gen.Appl. Microbiol 29:417-420.

Yamada, Y. and Kondo, K. 1984. *Gluconobacter,* anew subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone Q-10 in the genus *Acetobacter*. J.Gen.Appl. Microbiol 30:297-303.

Yamada, Y., Hoshino, K. and Ishikawa, T. 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequence of 16S ribosomal RNA:the evaluation of the subgenus *Gluconobacter*to the generic level. Biosci.Biotech. Biochem 61(8) :1244-1251.

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

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

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Acetobacter xylinum* และการเตรียม

ก. 1.1 สูตรอาหารน้ำมะพร้าวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (starter) (อังคณา พันธ์ศรี. 2541)

น้ำมะพร้าวแก่กรอง ต้มให้เดือดช้อนไขมันออก	1	ลิตร
แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 7H_2O$)	0.5	กรัม
น้ำตาลทราย (ซูโครส)	50	กรัม

ปรับให้มีความเป็นกรดเป็นด่าง 4.75 ด้วย 1นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริค

ก.1.2 สูตรอาหารน้ำมะพร้าวสำหรับหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (อังคณา พันธ์ศรี. 2541)

น้ำมะพร้าวแก่กรอง ต้มให้เดือดช้อนไขมันออก	1	ลิตร
แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต($NH_4H_2PO_4$)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 7H_2O$)	0.5	กรัม
น้ำตาลทราย (ซูโครส)	50	กรัม
วุ้นผง	1.5	กรัม

ปรับให้มีความเป็นกรดเป็นด่าง 4.75 ด้วย 1นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริค

ก. 1.3 สูตรอาหารน้ำชาสำหรับเลี้ยงเชื้อ

ชาอูหลง	20	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

ต้มให้เดือด กรองเอากากออก ก่อนใส่สารต่างๆดังนี้

แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 7H_2O$)	0.5	กรัม
น้ำตาลทราย (ซูโครส)	80	กรัม

ปรับให้มีความเป็นกรดเป็นด่าง 4.75 ด้วย 1นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริค

ก.1.4 สูตรอาหารน้ำชาสำหรับหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต

ชาอูหลง	20	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

ต้มให้เดือด กรองเอากากออก ก่อนใส่สารต่างๆดังนี้

แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต($NH_4H_2PO_4$)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 7H_2O$)	0.5	กรัม
น้ำตาลทราย (ซูโครส)	80	กรัม
วุ้นผง	1.5	กรัม

ต้มให้เดือด อีกครั้ง ปรับให้มีความเป็นกรดเป็นด่าง 4.75 ด้วย 1นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริค

ก.1.5 สูตรอาหารเหลว GEY(GEY broth) (Asai และคณะ,1968)

กลูโคส	20.0	กรัม
เอธานอล[1]	50.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

ปรับให้มีความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 ด้วย 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดัน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

[1]เมื่ออาหารเย็นตัวแล้วเติมเอธานอล 95% โดยวิธีปราศจากเชื้อ

ก.1.6 สูตรอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ (GEY-$CaCO_3$ agar) (Asai และคณะ, 1968)

กลูโคส	20.0	กรัม
เอธานอล[2]	50.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	3.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล

ปรับให้มีความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 ด้วย 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดัน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

[2]เติมเอธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ก่อนเทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1.7 สูตรอาหารวุ้น GYPG (GYPG agar) (Asai et.al., 1968)

กลูโคส	10.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
เปปโตน	10.0	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลีเซอรอล	10.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	3.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล

ปรับให้มีความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 ด้วย 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดัน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

ก.1.8 สูตรอาหาร Basal medium (Masuoka และคณะ,1968)

Basal medium :

Yeast Extract	5.0	gm.
Carbon sorce	10.0	gm.
Bromcresol purple	0.002%	
Distilled Water	1000	ml.

Carbon sources:-

L-arabinose	D-fructose
D-galactose	D-mannitol
D-mannose	D-xylose
Glycerol	Sucrose

ปรับให้มีความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 ด้วย 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดัน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

<u>หมายเหตุ</u> ในการทดลองนี้ใช้ Carbon sorce เป็นน้ำตาลทั้ง 8 ชนิด ในการเตรียมอาหาร 1 ลิตร จะใช้น้ำตาลแต่ละตัวในปริมาณที่เท่ากันคือ 1.25 กรัมต่อลิตร

ก.1.9 การเตรียมน้ำชา สำหรับการ แยกสารที่มีค่า Molecular weight ต่างๆกัน

ใช้ชาอูหลง	20	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

ต้มให้เดือด กรองเอาส่วนใสไปทำการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.2. สูตรอาหารสำหรับการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ

ก. 2.1 สูตรอาหารเหลว SBYP (SBYP broth) (Asai et.al., 1968)

โซเดียมอะซิเตท (CH3CooNa.3H2O) 2.0 กรัม

โบรโมไทมอลบลู	0.002%(w/v)	
ผงสกัดยีสต์	2.0	กรัม
เปปโตน	3.0	กรัม
น้ำกรอง	1000	มล.

ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง เป็น 6.4นึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิและความดัน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

ก.2.2 สูตรอาหารวุ้น CY (CY agar) (Asai et.al., 1968)

แคลเซียมแลคเตท	10.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	10.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกรอง	1000	มล.

ปรับให้มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 7.0นึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิและความดัน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

ก.2.3 สูตรอาหารเหลว GYPG (GYPG broth) (Asai et.al., 1968)

กลูโคส	10.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
เปปโตน	10.0	กรัม
กลีเซอรอล	10.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิและความดัน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

ก.2.4 สูตรอาหารเหลว GY (GY broth) (Asai et.al., 1968)

กลูโคส	20.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
น้ำกรอง	1000	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิและความดัน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์ทางเคมีและทางกายภาพ

ข.1 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดโดยใช้มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

ข.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (A.O.A.C, 1990)

สารเคมี 1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล

2. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน

วิธีการ

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

ปริมาณความเป็นกรดทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ $MW \times N \times V \times 100$

เมื่อ MW คือ มวลโมเลกุลของกรดอะซีติกมีค่าเท่ากับ 60.05 กรัมต่อโมล

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรต

V คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรต

ข.3 วิธีวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell numbers)

เตรียมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำมาเจือจางน้ำหมัก กระจายแบคทีเรียบนอาหารน้ำมะพร้าวตามภาคผนวก ก. ข้อ 1.2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วง 30–300 โคโลนี

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

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์
2. สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

วิธีการ

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

ข.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) (Dobois et al., 1956)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารละลายฟีนอล 5 %

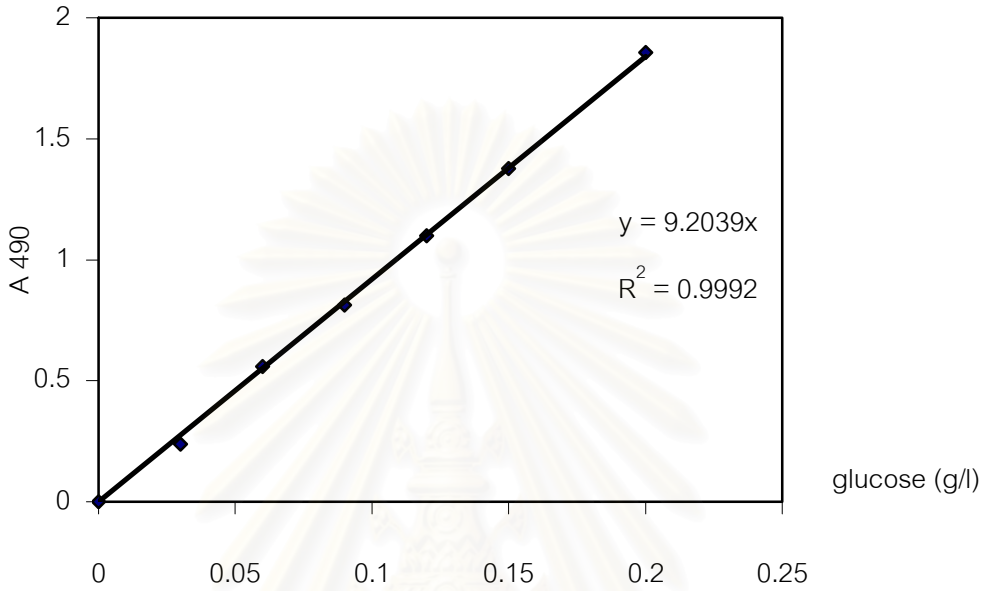
วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 5-100 กรัมต่อลิตร)
2. เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 % 1 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว
4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่อ 490 นาโนเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การคำนวณ

น้ำตาลทั้งหมด (g/L) เท่ากับ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร x อัตราการเจือจาง)
(ความชันของกราฟ)



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ข.6 วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry et.al, 1951)

อุปกรณ์

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต
2. สารละลายคอปเปอร์รีเอเจนต์
3. Folin ciocalteu reagent 1 N
4. สารละลาย Bovine serum albumin สำหรับทำกราฟมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีทดลอง

1. นำต.ย. 1 มิลลิลิตร ที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายคอปเปอร์รีเอเจนต์ 5.0 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันทันที และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
3. เติม Folin ciocalteu reagent 1 N 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ให้เกิดสีอย่างสมบูรณ์
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร
5. นำค่าที่วัดได้ มาหาปริมาณโปรตีนเทียบกับกราฟมาตรฐาน
6. การคำนวณ

ปริมาณโปรตีน (mg/ml) เท่ากับ $\frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร x อัตราการเจือจาง)}}{\text{(ความชันของกราฟ)}}$

ข.7 การวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก (ในรูป gallic acid)

ตามวิธีของ A.O.A.C. (1995)

อุปกรณ์

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1. Folin ciocalteu reagent 1 N
2. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

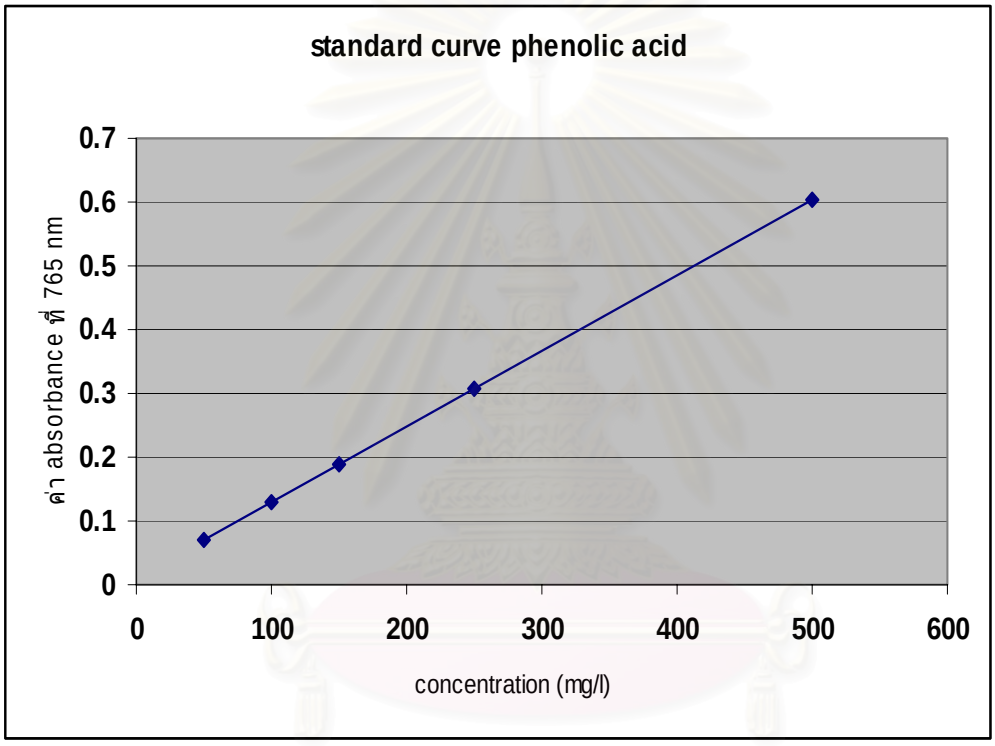
วิธีทดลอง

1. นำต.ย. 1 มิลลิลิตร ที่ต้องการวิเคราะห์ ใส่ใน volumetric flask 100 ml เติมน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร
2. เติม Folin ciocalteu reagent 1 N 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ 15 มิลลิลิตร
4. ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
5. ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

7. การคำนวณ

ปริมาณฟีนอลิก (mg/L) เท่ากับ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร x อัตราการเจือจาง)

(ความชันของกราฟ)



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานฟีนอลิก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

วิธีทดสอบทางชีวเคมีเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ

ค.1 ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) (Komagata, 1975)

- เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้บนอาหารวุ้น GYPG
- บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชม.
- หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2) 3% 1-2 หยด บนโคโลนี
- สังเกตการเกิดฟองแก๊ส

ค.2 ทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอะซิเตท (Oxidation of acetate)(Komagata, 1975)

- เขี่ยเชื้อลงในอาหารเหลว SBYPบ่มที่ 30 °ซ 7 วัน ในอาหารมี Bromothymol blue เป็น Indicator
- ดูการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ เปลี่ยนเป็นสีฟ้า ให้ผล + (basic)ไม่เปลี่ยนสี ให้ผล – (acid)

ค.3 ทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของแลคเตท (Oxidation of lactate) ไปเป็นคาร์บอเนต (Komagata, 1975)

- เขี่ยเชื้อลงในอาหารวุ้น CY
- บ่มที่ 30 °ซ 7 วัน
- สังเกตผล + จะเกิดลักษณะขาวขุ่นของแคลเซียมคาร์บอเนตรอบโคโลนี - ไม่เปลี่ยนแปลง

ค.4 ทดสอบการสร้างกรดกลูโคนิค (Gossele และคณะ, 1980)

- นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว GY
- บ่มที่ 30 °ซ 7 วัน
- สังเกตการเกิดสี ผลเป็น + ถ้าให้สีน้ำตาลเข้ม - ถ้าไม่เปลี่ยนสี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค.5 ทดสอบการสร้างอะซิติล เมทธิล คาร์บินอล (Acetyl methyl carbinol) จากแคลเซียม แลคเตท (Gossele และคณะ, 1980)

- นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว CY
- บ่มที่ 30 °ซ 7 วัน
- เติมแอลฟาแนปทอล 0.5 มล. แล้วเขย่าผสม
- เติมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 มล. แล้วเขย่าผสม
- ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที ให้ผล + จะให้สีชมพูถึงแดง – ไม่เกิดสี

ค.6 ทดสอบการใช้กรดกลูตามิค (glutamic acid)(Asai และคณะ, 1964)

- นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารวุ้น GG
- บ่มที่ 30 °ซ 7 วัน
- แสดงผล + เมื่อเชื้อสามารถเจริญบนอาหารนี้ได้
  แสดงผล – เมื่อเชื้อไม่สามารถเจริญบนอาหารนี้ได้

ค7 ทดสอบการเจริญบนอาหารวุ้น โฮเยอร์-เฟรเทอร์ (Hoyer -Frateur agar) (Komagata, 1975)

- นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารวุ้น Hoyer -Frateur agar
- บ่มที่ 30 °ซ 7 วัน
- แสดงผล + เมื่อเชื้อสามารถเจริญบนอาหารนี้ได้
  แสดงผล – เมื่อเชื้อไม่สามารถเจริญบนอาหารนี้ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

การย้อมแกรมเชื้อ

การย้อมเชื้อโดยวิธีแกรม (Gram's stain) ดัดแปลงโดย Hucker มีวิธีการดังต่อไปนี้

1. เตรียมฟิล์มบางๆ (smear) ของเชื้อแบคทีเรียบนสไลด์ที่สะอาด
2. ตั้งทิ้งไว้ให้รอยฟิล์มนั้นแห้งในอากาศ
3. fix smear โดยใช้ความร้อน
4. ย้อมสีโดยวางสไลด์ที่มีฟิล์มของเชื้อบนแท่งแก้ววางสไลด์ที่พาดอยู่บนอ่างน้ำ หยดสี Gram's crystal violet ให้ท่วมรอยฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 นาที รินสีที่เหลือออก ล้างด้วยน้ำประปา
5. หยด Gram's iodine solution ให้ท่วมฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 นาที รินสีที่เหลือออก แล้วล้างด้วยน้ำประปา
6. ล้างสีออก (decolorize) ด้วยแอลกอฮอล์ 95% แล้วล้างด้วยน้ำประปา
7. ย้อมทับด้วย Gram's safranin solution ทิ้งไว้ 10-20 วินาที รินสีที่เหลือออก ล้างด้วยน้ำประปา ทิ้งให้ฟิล์มแห้งเองในอากาศ
8. นำสไลด์ไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุน้ำมัน (oil immersion objective lens)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพันทิพา โพธิ์วัน เกิดวันที่ 5 ธันวาคม 2520 ที่จังหวัดสิงห์บุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2543 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2544

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย