บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

เซลลูโลส(cellulose) เป็นสารไบโอพอลิเมอร์ที่สำคัญของโลก โดยเป็นองค์ประกอบของพืชมีโครงสร้างคล้าย amylose เป็น homopolysaccharide ที่มีหน่วยย่อยเป็นกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 glycoside (Brown,Willison and Richardson,1976) และไม่มีแขนง โซ่ยาวที่ต่อกันนี้จะมาเกาะรวมเป็นพันธะไฮโดรเจนเรียกว่าเส้นใย(fibril)(Brown และคณะ,1976) ทำให้ไม่ละลายน้ำและแข็งแรง เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญในฝ้าย(มากกว่า 94 เปอร์เซ็นต์) และไม้ (มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) ทั้งฝ้ายและไม้เป็นแหล่งที่สำคัญของผลิตภัณฑ์เซลลูโลสทั้งหมด เช่น กระดาษ, สิ่งทอ, วัสดุโครงสร้าง, กระดาษแข็งและโดยเฉพาะอนุพันธ์ของเซลลูโลสเช่น เซลโลเฟน (cellophane), เรยอน (rayon) และเซลลูโลสแอซีเทต เซลลูโลสจากพืชได้แก่เส้นใยฝ้ายโดยสมอฝ้ายจะถูกเก็บเกี่ยวและเส้นใยจะถูกดึงออกจากเมล็ดแล้วผ่านกรรมวิธีต่างๆจนเป็นม้วนด้ายเพื่อผลิตเป็นเสื้อผ้า ต้นไม้และตอไม้จากป่าจะนำเข้าโรงเลื่อยเพื่อตัดแต่งและอบแห้ง แล้วส่งไปยังโรงงานทำกระดาษ โดยเนื้อไม้จะถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ และผ่านกรรมวิธีจนได้เป็นเยื่อกระดาษที่หนาและชุ่มน้ำ วิธีการนี้ต้องใช้พลังงานและกรรมวิธีทางเคมีที่เป็นอันตรายต่อสภาวะแวดล้อมอย่างมาก เพราะต้องกำจัดลิกนินที่ไม่ต้องการออกไป และเซลลูโลสที่ได้ยังต้องฟอกสีอีก

1.2 แหล่งของเซลลูโลส

เซลลูโลสจากพืชบนดิน เช่น ฝ้าย และ ป่าไม้ เกิดจากกลูโคสซึ่งผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในพืชและเป็นแหล่งผลิตเซลลูโลสที่ใหญ่ที่สุด ส่วนในมหาสมุทรเซลลูโลสจะผลิตโดยแพลงตอน (plankton) และสาหร่ายโดยใช้กระบวนการสังเคราะห์แสง และเป็นผู้เริ่มต้นในห่วงโซ่อาหาร เห็ดราและแบคทีเรียสามารถสร้างเซลลูโลสได้โดยไม่ผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง แต่ใช้กลูโคสและอินทรีย์ซับสเตรตในการสังเคราะห์เซลลูโลส

1.3 การผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*

การผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* มี 2 วิธีดังนี้

1.3.1 การผลิตเซลลูโลสในภาวะนิ่ง (static culture)

ในปี ค.ศ. 1954 Schramnและ Hestrinได้ทำการศึกษา *A. xylinum* ในภาวะนิ่งโดยใช้สูตรอาหาร Schramn & Hestrin (Schramn and Hestrin,1954) ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัม, สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัม, เพปโทน 5 กรัม, โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.7 กรัม และกรดมะนาว 1.15 กรัม ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 พบว่าเมื่อใช้อาหารสูตรดังกล่าวและหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ได้ปริมาณเซลลูโลส 32 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ *A. xylinum* จะผลิตเซลลูโลสอยู่ที่ผิวหน้าของอาหารและมีรูปทรงตามภาชนะที่บรรจุอาหาร

ในประเทศฟิลิปปินส์รู้จักเซลลูโลสที่ผลิตจาก *A. xylinum* ในชื่อ Nata de Coco ใช้เป็นอาหารว่างของชาวฟิลิปปินส์ ส่วนในประเทศไทยเรียกว่าวุ้นสวรรค์ หรือวุ้นน้ำมะพร้าว การผลิตส่วนใหญ่จะใช้น้ำมะพร้าวแก่ที่เหลือใช้มาเป็นอาหารเลี้ยง *A. xylinum* ในประเทศไทยแต่ละปีจะมีน้ำมะพร้าวประมาณสามพันล้านลิตรที่เหลือจากการใช้มะพร้าวแก่และทิ้งไป การนำน้ำมะพร้าวมาผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวจะช่วยลดปัญหามลพิษทางน้ำได้ การผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน ในปี พ.ศ. 2531 สมศรีได้รายงานว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับทำวุ้นน้ำมะพร้าว โดย *A. xylinum* สายพันธุ์ TISTR 86 ประกอบด้วย น้ำมะพร้าว 1 ลิตร ซูโครส 50 กรัม เอทานอล 60 มิลลิลิตร แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.3 กรัม เมื่อใช้อาหารสูตรดังกล่าวและหมักที่อุณหภูมิห้อง (27-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วันจะได้แผ่นเซลลูโลสหนา 2.5 เซนติเมตร ในปี พ.ศ. 2536 วราวุฒิและคณะได้ผลิตเซลลูโลสในภาวะนิ่ง โดยกรองน้ำมะพร้าวด้วยผ้าขาวบางแล้วเติมน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณ 6 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ (W/V) นำไปต้มให้เดือดแล้วทิ้งไว้ให้เย็น จึงนำมาเติมน้ำส้มสายชู (เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (V/V) และเติมหัวเชื้อ *A. xylinum* ที่เตรียมไว้ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์(V/V) นำส่วนผสมทั้งหมดถ่ายใส่โถแก้วปากกว้าง ปิดโถด้วยผ้าขาวบาง แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาด ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วจึงนำมาแช่น้ำในอัตราส่วนชิ้นวุ้นต่อน้ำเท่ากับ 1: 500 เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ซึ่งจะลดปริมาณกรดแอซีติกหรือน้ำส้มสายชูที่เติมลงไปในระหว่างการหมักไม่ให้เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ เซลลูโลสที่ได้มักจะมีสีครีมหรือขาวขุ่นดังนั้นถ้าจะฟอกสีก็สามารถทำได้โดยใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (V/V) ในปี ค.ศ. 1993 Satoshi และคณะได้ทำการศึกษา *A. xylinum* สายพันธุ์ IFO 13690 ในภาวะนิ่งโดยใช้สูตรอาหารSchramn & Hestrin(Schramn and Hestrin,1954) เมื่อใช้อาหาร

สูตรดังกล่าวและหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะได้เซลลูโลส 36 กรัมต่อวันต่อตารางเมตร ซึ่งเป็นสัดส่วนกับพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ปริมาณเซลลูโลสไม่ขึ้นกับความลึกและปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการผลิตในภาวะนิ่งมีข้อจำกัดหลายประการคือปริมาณออกซิเจนและสารอาหาร เพราะถูกขวางโดยแผ่นของเซลลูโลสที่ถูกสร้างลอยอยู่ที่ผิวหน้าของอาหาร (Schramn,Gromet and Hestrin,1957) อีกทั้งยังต้องใช้พื้นที่ในการผลิตมากและยังมีโอกาสที่จะปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ง่าย รวมทั้งยังใช้เวลาในการเลี้ยงนาน 7-14 วัน จึงไม่เหมาะที่จะทำในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่

1.3.2 การผลิตเซลลูโลสในภาวะที่มีการกวน (agitation culture)

ในปี ค.ศ.1960 Dudman ได้ศึกษา *A. xylinum* สายพันธุ์ HCC B-155 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ใช้สูตรอาหาร hydrolyzed molasses ประกอบด้วยน้ำตาล 4-5 เปอร์เซ็นต์ (W/V) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.3 เปอร์เซ็นต์(W/V) และโพแทสเซียมฟอสเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ (W/V) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 เมื่อใช้อาหารสูตรดังกล่าวและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วันจะได้เซลลูโลส 2.5 กรัมต่อลิตร ต่อมาในปี ค.ศ. 1989 Johnson และ Neogi ได้กลายพันธุ์ *A. xylinum* สายพันธุ์ NRRL-B42 โดยใช้ ethyl methane sulfonate(EMS)เป็นสารกลายพันธุ์(mutagent) ได้ *A. xylinum* สายพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้ในปริมาณมากกว่า *A. xylinum* สายพันธุ์ NRRL-B42 คือ *A. xylinum* สายพันธุ์ ATCC 53263, 53264 และ 53524 เมื่อใช้อาหาร Corn steep liquor(CSL)(Johnson and Neogi,1989) ปริมาตร 12 ลิตร ในถังหมักขนาด 14 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หัวเชื้อตั้งต้นจะผ่านเครื่อง homogenizer เพื่อทำให้ได้เซลล์แขวนลอยก่อนถ่ายใส่ถังหมัก ระหว่างการเลี้ยงเติมกลูโคสที่มีความเข้มข้น 143 กรัมต่อลิตร เมื่อในถังหมักมีปริมาณเซลลูโลสมากขึ้นก็เพิ่มอัตราการกวนขึ้นจาก 600 รอบต่อนาทีเป็น 1200 รอบต่อนาที เมื่อใช้อาหารสูตรดังกล่าวเลี้ยงเป็นเวลา 4 วันได้ปริมาณเซลลูโลส 12.7 กรัมต่อลิตร ในปี ค.ศ. 1992 Ogawa และคณะได้เปรียบเทียบเซลลูโลสจากการเลี้ยงในภาวะนิ่งและภาวะที่มีการกวนของ *A. xylinum* สายพันธุ์ ATCC 10245 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Schramn & Hestrin(Schramn and Hestrin,1954) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในภาวะที่มีการกวนใช้อัตราการกวน 20 รอบต่อนาทีเมื่อใช้อาหารสูตรดังกล่าวและเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ปรากฏว่าปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงในภาวะนิ่งมากกว่าปริมาณเซลลูโลสของการเลี้ยงในภาวะที่มีการกวน แต่เซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงในภาวะที่มีการกวนแข็งแรงกว่าเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงในภาวะนิ่ง การผลิตเซลลูโลสในภาวะที่มีการกวนโดย *A.xylinum* โดยมากจะปรับปรุงกระบวนการผลิตและกลายพันธุ์แต่ยังไม่มีวิธี

ที่เหมาะสมในการคัดเลือก *A. xylinum* จากธรรมชาติสำหรับการผลิตเซลลูโลสในภาวะที่มีการกวน จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1995 Hiroshi และคณะได้ศึกษาวิธีการคัดเลือก *A. xylinum* สำหรับการผลิตเซลลูโลสในภาวะที่มีการกวนโดยใช้อาหาร Schramn & Hestrin(Schramn and Hestrin,1954) สำหรับการคัดเลือกขั้นแรกจากผลไม้ ถั่ว ดอกไม้ ดินได้จำนวน 2096 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเซลลูโลสจากจำนวนตัวอย่าง 547 ตัวอย่าง นำ *A. xylinum* จำนวน 2096 สายพันธุ์มาทำการคัดเลือกในระดับขวดเขย่าโดยใช้อาหาร CSL พบว่ามีเพียง 282 สายพันธุ์เท่านั้นที่มีปริมาณเซลลูโลสมากกว่า 1 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำ 282 สายพันธุ์มาผลิตเซลลูโลสในถังหมักขนาด 1 ลิตรโดยใช้อาหาร CSL พบว่ามี 97 สายพันธุ์ที่ผลิตเซลลูโลสได้มากกว่า 2.4 กรัมต่อลิตรและมี 1 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงสุด 4.4 กรัมต่อลิตร

1.4 ลักษณะโดยทั่วไปของ *A. xylinum*

เซลล์ของ *A. xylinum* มีหลายลักษณะปกติพบรูปร่างค่อนข้างรี จนกระทั่งเป็นท่อนชัดเจนเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ขนาดกว้างประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน ยาวประมาณ 1.0-3.0 ไมครอน อาจพบเป็นเซลล์เดี่ยวๆจับกันเป็นคู่หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ *A. xylinum* ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ *A. xylinum* ไม่พบการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ แต่เมื่ออยู่รวมกันมากๆ อาจมีสีชมพู เนื่องจากอิทธิพลของพอร์พิริน (porphyrin) และบางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล (Deley and Fracteur, 1974) *A. xylinum* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการดำรงชีวิต (strictly aerobic bacteria) เนื่องจากไม่สามารถใช้สารอื่นนอกจากออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้ายในกระบวนการเปลี่ยนแปลงอาหารเป็นพลังงานได้ (Deley and Fracteur, 1974) จึงมักพบในถังหมักน้ำส้มสายชูโดยเจริญอยู่ที่ผิวหน้ามองเห็นเป็นแผ่นฝ้า (Adum, 1960) *A. xylinum* เป็นเชื้อที่ไม่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และไม่รีดิวซ์ไนเทรตไปเป็นไนไทรต และยังพบว่าไนเทรตเป็นพิษต่อ *A. xylinum* และยังมีผลในการยับยั้งการสร้างเซลลูโลส (Alaban,1962) ลักษณะการเจริญของ *A. xylinum* บนอาหารแข็ง โคโลนีจะมีรูปร่างกลม ทึบแสง ขอบของโคโลนีไม่มีรอยหยักหรือเว้า ความนูนของโคโลนีเป็นรูปกลมนูน โค้งสูงจากผิวหน้าอาหารมีทั้งที่โค้งไม่มาก(convex) จนถึงโค้งจากผิวหน้าของอาหารมากจนเกือบเป็นรูปวงกลม โคโลนีมีลักษณะคล้ายยางเหนียวขนาด 1.2 มิลลิเมตร และมีเมือกเยิ้มใสรอบๆโคโลนี (Alaban,1962) ส่วนการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ถ้าเลี้ยงในภาวะนิ่งช่วงแรกจะมีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มโปร่งใสบนผิวหน้าอาหาร และจะเพิ่มความหนาขึ้นทีละน้อยจนกลายเป็นสารที่มีลักษณะเป็นเยื่อเหนียว เมื่อเขย่าเยื่อเหนียวนี้จะจม และมีการสร้างเยื่อขึ้นมาใหม่ที่ผิวหน้าของอาหารภายใต้ภาวะที่เหมาะสม เยื่อเหนียวที่สร้างขึ้นมาอาจหนาถึง

2 นิ้ว หรือมากกว่านี้ภายในระยะเวลา 1 เดือน (Saturnino and Dimaguill,1967 และ Lapuz, Gallardo and Palo,1967)

1.5 <u>ชีวเคมีของการสังเคราะห์เซลลูโลสจาก *A. xylinum*</u>

Swissa และคณะ (1980) ได้ศึกษาขั้นตอนการสังเคราะห์เซลลูโลสของ *A. xylinum* และได้ยืนยันอย่างแน่ชัดว่ามีลำดับดังนี้

Glucose

ATP ↓ glucokinase

Glucose-6-phosphate

↑↓ phosphoglucomutase

Glucose-1-phosphate

↓ UDP-glucose pyrophosphorylase

UDP-glucose

↓ cellulose synthase

Cellulose

สำหรับระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูโลสมีดังนี้คือ

ขั้นตอนที่ 1 กลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate โดยปฏิกิริยา phosphorylation ซึ่งมีเอนไซม์ glucokinase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยมีพลังงาน (ATP) ร่วมด้วย

ขั้นตอนที่ 2 เอนไซม์ phosphoglucomutase จะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนกลับไปกลับมา (interconversion) ของ glucose-6-phosphate ไปเป็น glucose-1-phosphate

ขั้นตอนที่ 3 เอนไซม์ UDP-glucose pyrophosphorylase จะทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่าง UDP กับ glucose-1-phosphate เปลี่ยนไปอยู่ในรูป UDP-glucose

ขั้นตอนที่ 4 เอนไซม์ cellulose synthase เปลี่ยน UDP-glucose ไปเป็นเซลลูโลส

1.6 <u>ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเซลลูโลส</u>

1.6.1 ปริมาณหัวเชื้อ (inoculum)

ปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตเซลลูโลสจะต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม โดยพบว่าปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเลี้ยงในภาวะนิ่งอยู่ในช่วง 5-10 เปอร์เซ็นต์(V/V) (Alaban,1962) แต่ในภาวะนิ่งถ้าใช้ปริมาณหัวเชื้อมากขึ้นกลับปรากฏว่าได้ผลผลิตต่ำลง

(สมคิด,2531) สำหรับปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงในภาวะที่มีการกวนอยู่ที่ 5 เปอร์เซ็นต์(V/V)

1.6.2 ความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรด-ด่าง ย่อมมีอิทธิพลต่อการหมักเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ต่างกัน โดยทั่วไป *A. xylinum* จะสามารถสร้างเซลลูโลสได้ดีในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 4-5 และจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 4-6 แต่แบคทีเรียโดยส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ดังนั้นลักษณะเฉพาะอีกอย่างหนึ่งของ *A. xylinum* คือเจริญได้ในอาหารที่มีความเป็นกรด (Alaban,1962)

1.6.3 อุณหภูมิ

A. xylinum เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 15-42 องศาเซลเซียส การเจริญที่อุณหภูมิ 12-15 องศาเซลเซียส *A. xylinum* จะเจริญได้ช้า แต่ถ้าใช้อุณหภูมิ 28-34 องศาเซลเซียส จะเจริญได้อย่างปกติ ส่วนที่อุณหภูมิ 42-45 องศาเซลเซียส เซลล์จะมีรูปร่างแบบเส้นด้ายโปร่งใส (Alaban,1962) โดยทั่วไป *A. xylinum* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส และสามารถสร้างเซลลูโลสได้ดีที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่ควรต่ำกว่าหรือสูงกว่า 27-34 องศาเซลเซียส เพราะถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 27 องศาเซลเซียส การเพิ่มจำนวนเซลล์และการผลิตเซลลูโลสจะต่ำลง และถ้าใช้อุณหภูมิสูงเกินไปการเพิ่มจำนวนเซลล์และการผลิตเซลลูโลสจะต่ำลงหรือหยุดลงได้ (Alaban,1962 และ ทองสุกและวิชาญ,2529)

1.6.4 ออกซิเจน

เนื่องจาก *A. xylinum* ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ในปี ค.ศ. 1995 Kunihiko และ Shigeruได้ศึกษา *A. xylinum* สายพันธุ์ ATCC 10812, ATCC 23769 เมื่อเลี้ยงในภาวะนิ่งและควบคุมแรงดึงของออกซิเจน(oxygen tension) 10, 20, 30, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อให้ 1 บรรยากาศเท่ากับแรงดึงของออกซิเจน 100 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 50 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม โพแทสเซียมฟอสเฟต 3 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 เมื่อใช้อาหารสูตรดังกล่าวและหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วันพบว่าแรงดึงออกซิเจน 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ให้

ความหนาของเซลลูโลส 0.6 เซนติเมตร ซึ่งมากกว่าแรงดึงออกซิเจน 30, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ให้ความหนาของเซลลูโลส 0.25, 0.21 และ 0.18 เซนติเมตรตามลำดับ

1.6.5 สารแหล่งคาร์บอน

น้ำตาลเป็นแหล่งของคาร์บอนให้ *A. xylinum* เจริญเติบโตและสร้างเซลลูโลส โดย *A. xylinum* สามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด โดย ฟรุกโทส แมนนิทอล ซอร์บิทอล และกลูโคส จะให้การเจริญและผลิตเซลลูโลสที่เร็ว ส่วนกลีเซอรอล กาแลกโทส แลกโทส มอลโทส และซูโครส ให้การเจริญและผลิตเซลลูโลสต่ำกว่า (Johnson and Neogi,1989)

1.6.6 สารประกอบไนโตรเจน

A. xylinum ต้องการไนโตรเจนเพื่อการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลิอิก โดยส่วนใหญ่จะใช้ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$) แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ โดยใช้ในปริมาณ 0.5-0.6 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามสารประกอบไนโตรเจนที่เติมลงไปควรคำนึงถึงชนิดของสายพันธุ์ของ *A.xylinum* ด้วยเพราะว่าความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจนต่างกัน ส่วนสารประกอบของไนเทรตเป็นพิษต่อ *A.xylinum* และยังมีผลในการยับยั้งการสร้างเซลลูโลส (Alaban,1962)

1.7 <u>คุณสมบัติและลักษณะของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย</u>

เซลลูโลสจาก *A. xylinum* เป็นสารพอลิเมอร์ทางชีวภาพที่มีความบริสุทธิ์สูงปราศจากลิกนินและเฮมิเซลลูโลสย่อยสลายทางชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ นอกจากนี้ยังมีความคงตัวสูง น้ำหนักเบา อายุการใช้งานยาวนาน มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดี

เส้นใยของเซลลูโลสจาก *A. xylinum* มีขนาดกว้าง 3-6 นาโนเมตร หนา 9-15 นาโนเมตร ส่วนความยาวไม่จำกัดขึ้นกับภาวะที่เลี้ยง เส้นใยของเซลลูโลสจะประกอบด้วย ribbon ที่มีขนาด 1.5-3 นาโนเมตรหลายๆเส้นมารวมกันเป็น เส้นใย(fibril)(Peter, Raphael and Moshe,1991)

1.8 <u>ประโยชน์ของเซลลูโลส</u>

เซลลูโลสจาก *A. xylinum* สามารถนำไปทำทั้งอาหารคาวและอาหารหวานเช่น วุ้นสวรรค์ ไอศกรีมแคลอรีต่ำ ลูกอม และยังเป็นสารให้ความหนืด และทางการแพทย์ก็นำไปใช้ ลดปริมาณคอเลสเทอรอลในเส้นเลือด(Stephen and Westland, 1990) นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบในครีม

ทาผิว ใช้ทำเล็บปลอม และเป็นสารให้ความหนืดในยาทาเล็บ และยังนำไปใช้ในผลิตเป็นลำโพงคุณภาพสูง

1.9 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารไบโอพอลิเมอร์ที่สำคัญของโลก แต่โดยส่วนใหญ่เราจะนำเซลลูโลสมาจากพืช ซึ่งสามารถแปรรูปมาเป็นเครื่องอุปโภคได้มากมายหลายชนิด เมื่อจำนวนประชากรของโลกเพิ่มขึ้นปริมาณการใช้เซลลูโลสจึงเพิ่มขึ้น แต่เซลลูโลสสามารถผลิตจากจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะ *A. xylinum* สามารถผลิตเซลลูโลสได้บริสุทธิ์กว่าเซลลูโลสที่ได้จากพืช จึงได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง แต่โดยส่วนใหญ่การผลิตเซลลูโลสจะผลิตในภาวะนิ่ง ซึ่งจะต้องใช้พื้นที่ในการผลิตมาก ระยะเวลาในการผลิตนาน 7-14 วัน ใช้แรงงานมาก และเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งจากข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ได้ ปัจจุบันจึงเริ่มให้ความสนใจในการผลิตเซลลูโลสในภาวะที่มีการกวน เพราะสามารถผลิตได้ในปริมาณมากและระยะเวลาในการผลิตสั้นลง ใช้เวลาประมาณ 2-3 วันและสามารถพัฒนาไปเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ได้ แต่ก็มีปัญหาที่ต้องได้รับการแก้ไขอีกหลายประการ คือ *A. xylinum* โดยทั่วไปจะผลิตเซลลูโลสได้น้อยลงเมื่ออยู่ในภาวะที่มีการกวน เพราะว่า *A. xylinum* กลายพันธุ์เป็น *A. xylinum* ที่ไม่ผลิตเซลลูโลสได้ง่าย ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาแนวทางการผลิตเซลลูโลสในภาวะที่มีการกวนให้สามารถผลิตเซลลูโลสได้ อีกทั้งยังได้ปรับปรุงขั้นตอนการผลิตให้ลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และพยายามพัฒนารูปร่างของเซลลูโลสที่ผลิตได้ในภาวะที่มีการกวนให้มีรูปร่างที่เป็นเม็ด(pellet) เพื่อที่จะสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้ง่าย

1.10 ขั้นตอนการวิจัย

1.10.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อบนอาหารแข็งและอาหารเหลวโดยไม่ให้เซลล์เกาะติดกับสายใยเซลลูโลสเป็นก้อนหรือเป็นแผ่นคือให้เซลล์อยู่ในรูปเซลล์เดียว

1.10.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสในถังหมักที่มีระบบการกวนขนาด 5 ลิตร