บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 วุ้นน้ำมะพร้าว (Nata de Coco)

วุ้นน้ำมะพร้าว หรือที่เรียกว่า วุ้นสวรรค์ วุ้นน้ำส้ม ลูกพร้าวหรือเห็ดรัสเซีย เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำมะพร้าวแก่โดยใช้เชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเซลลูโลส (bacterial cellulose) สูงมาก เป็นเวลา 8-14 วัน แผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวหรือแผ่นวุ้นเซลลูโลส (cellulose pellicle) ที่ได้จากการหมักแบบวางนิ่ง (static fermentation) ซึ่งยังไม่ผ่านการแปรรูป มีลักษณะเป็นเยื่อเหนียว (cartilaginous pellicle) ที่มีสีครีมหรือสีเหลืองอ่อน และมีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ เส้นใยเซลลูโลสที่มีอยู่ประมาณ 1 % w/w และน้ำที่อยู่ในโครงสร้างของร่างแหเซลลูโลสประมาณ 99 % w/w

2.2 ลักษณะ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*

A. aceti subsp. *xylinum* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเซลลูโลสสูง จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่ามีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ขนาด 2 x 0.6 ถึง 0.8 ไมครอน เซลล์ที่มีอายุน้อยย้อมติดสีแกรมลบแต่เมื่ออายุมากขึ้นจะย้อมติดได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือต่อกันเป็นลูกโซ่ โคโลนีมีลักษณะกลม นูน ทึบแสง เป็นเยื่อเหนียวสีน้ำตาลอ่อน ผิวเรียบเป็นมัน ขอบเกลี้ยงไม่มีรอยหยักและมีขนาดเล็กประมาณ 1-2 มิลลิเมตรบนอาหารแข็ง (Lapuz, Gallado and Palo, 1967) เซลลูโลสที่เชื้อ *A. xylinum* สร้างขึ้นจะทำหน้าที่ป้องกันเซลล์แบคทีเรียจากแสงยูวี รวมถึงแบคทีเรียชนิดอื่นและเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็งเดียวกัน(Williams and Cannon, 1989) *A. xylinum* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ (obligate aerobe) สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ไม่สร้างสี (pigment) ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตหรือย่อยเจลลาติน ไม่สร้างอินโดล (indole) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไม่สามารถย่อยแป้ง สามารถเจริญในอาหารที่มีเอธานอลเป็นส่วนประกอบไม่เกินร้อยละ 6 สามารถออกซิไดซ์เอธานอลเป็นกรดอะซีติกได้และสามารถเปลี่ยนกรดอะซีติกเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ (overoxidize) (Alaban, 1962; Lapuz et al., 1967)

2.3 การสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของ *A. xylinum*

เมื่อเลี้ยง *A. xylinum* ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบในการหมักแบบวางนิ่ง ในวันแรกเชื้อจะใช้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวในการสร้างสายเซลลูโลส (insoluble polyglucan chain) และสร้างสายเซลลูโลสออกมานอกเซลล์ เมื่อสายเซลลูโลสดังกล่าวมีจำนวนมากขึ้นก็จะสานและรวมตัวกันจนเห็นเป็นสายเส้นใยสีขาวขุ่นที่ค่อยๆลอยขึ้นสู่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะนี้อาหารเหลวจะขุ่นและยังไม่ปรากฏแผ่นวุ้นบนผิวหน้าของอาหาร จากนั้นในวันที่ 2 ของการเลี้ยงอาหารเหลวจะเริ่มใสขึ้นและเส้นใยดังกล่าวจะเริ่มสานตัวกันเกิดเป็นร่างแหของเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นแผ่นวุ้นเซลลูโลสสีขาวขุ่นลอยอยู่บนผิวหน้าของอาหารเหลว ในขณะนี้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารมีค่าเกือบเป็นศูนย์และเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้มีแต่เชื้อที่บริเวณผิวหน้าของแผ่นวุ้นที่สัมผัสกับอากาศเท่านั้น ซึ่งพิสูจน์ได้จากการทดลองของ Masaoka, Ohe และ Sakota (1993) ที่ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* IFO 13693 ในอาหารสังเคราะห์ในภาชนะที่ติดตะแกรงที่มีรูขนาด 22 ไมครอนในตำแหน่งต่ำกว่าผิวหน้าของอาหารเหลวเท่ากับ 11 มิลลิเมตร เมื่อทำการเลี้ยงนาน 4 วันพบว่ามีการสร้างเซลลูโลสที่ผิวหน้าของอาหารเหลว แต่ไม่มีการสร้างเซลลูโลสในอาหารที่อยู่ภายใต้ตะแกรงเลย แสดงว่ามีเฉพาะเซลล์แบคทีเรียมีชีวิตที่อยู่ใกล้ผิวหน้าของอาหารเหลวเท่านั้นที่สร้างเซลลูโลส

เนื่องจาก *A. xylinum* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญและการที่อาหารเหลวใสขึ้นในเวลาเดียวกับการปรากฏของแผ่นวุ้นเซลลูโลสบนผิวหน้าของอาหารเหลว ดังนั้นจึงมีการสันนิษฐานว่าแผ่นวุ้นดังกล่าวทำหน้าที่นำพาเซลล์แบคทีเรียขึ้นสู่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีความเข้มข้นของออกซิเจนสูงกว่า โดยอาศัยฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียและถูกกักเก็บไว้ในโครงสร้างที่เป็นร่างแหเซลลูโลสของแผ่นวุ้น (Schramm and Hestrin, 1954) จากการทดลองของ Schramm และ Hestrin (1954) พบว่าเชื้อจะสร้างชั้นของแผ่นวุ้นใหม่ขึ้นบนผิวหน้าของแผ่นวุ้นด้านที่สัมผัสกับอากาศ (film/medium interface) และชั้นของแผ่นวุ้นเก่าจะจมลงสู่ด้านล่าง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Borzani และ Souza (1995) และอังคณา พันธุ์ศรี (2541) แผ่นวุ้นเซลลูโลสที่ได้จึงมีลักษณะเป็นชั้นของร่างแหเซลลูโลสจำนวนมากซ้อนทับกันอยู่

เนื่องจากการสร้างเซลลูโลสในการหมักแบบวางนิ่งจะเกิดเฉพาะที่ผิวหน้าของอาหารเหลวซึ่งสัมผัสกับอากาศเท่านั้น ดังนั้นปริมาณเซลลูโลสที่เชื้อสร้างได้จึงเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่ขึ้นกับปริมาตรและความสูงของอาหารเหลวแต่อย่างใด (Masaoka et al., 1993) อัตราการสร้างแผ่นวุ้นและเซลลูโลสของเชื้อขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของเชื้อ อายุและปริมาณของหัวเชื้อตั้งต้น ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ระยะเวลาในการเลี้ยงและพื้นที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น อย่างไรก็ตามความหนาของแผ่นวุ้นจะเพิ่มขึ้นด้วยอัตราเร็วเกือบคงที่ในช่วง 2-5 วันแรกของการเลี้ยงและจะลดลงในวันต่อๆมา (อังคณา พันธุ์ศรี, 2541) ในขณะที่อัตราการสร้างเซลลูโลสของเชื้อจะสูงที่สุดในระยะ 8 วันแรกของการเลี้ยงและจะลดลงหลังจากนั้น แม้ว่า 70-75% ของปริมาณเซลลูโลสที่เชื้อสร้างทั้งหมดจะสร้างขึ้นในช่วง 8-9 วันแรกของการเลี้ยง แต่เชื้อจะยังคงสร้าง

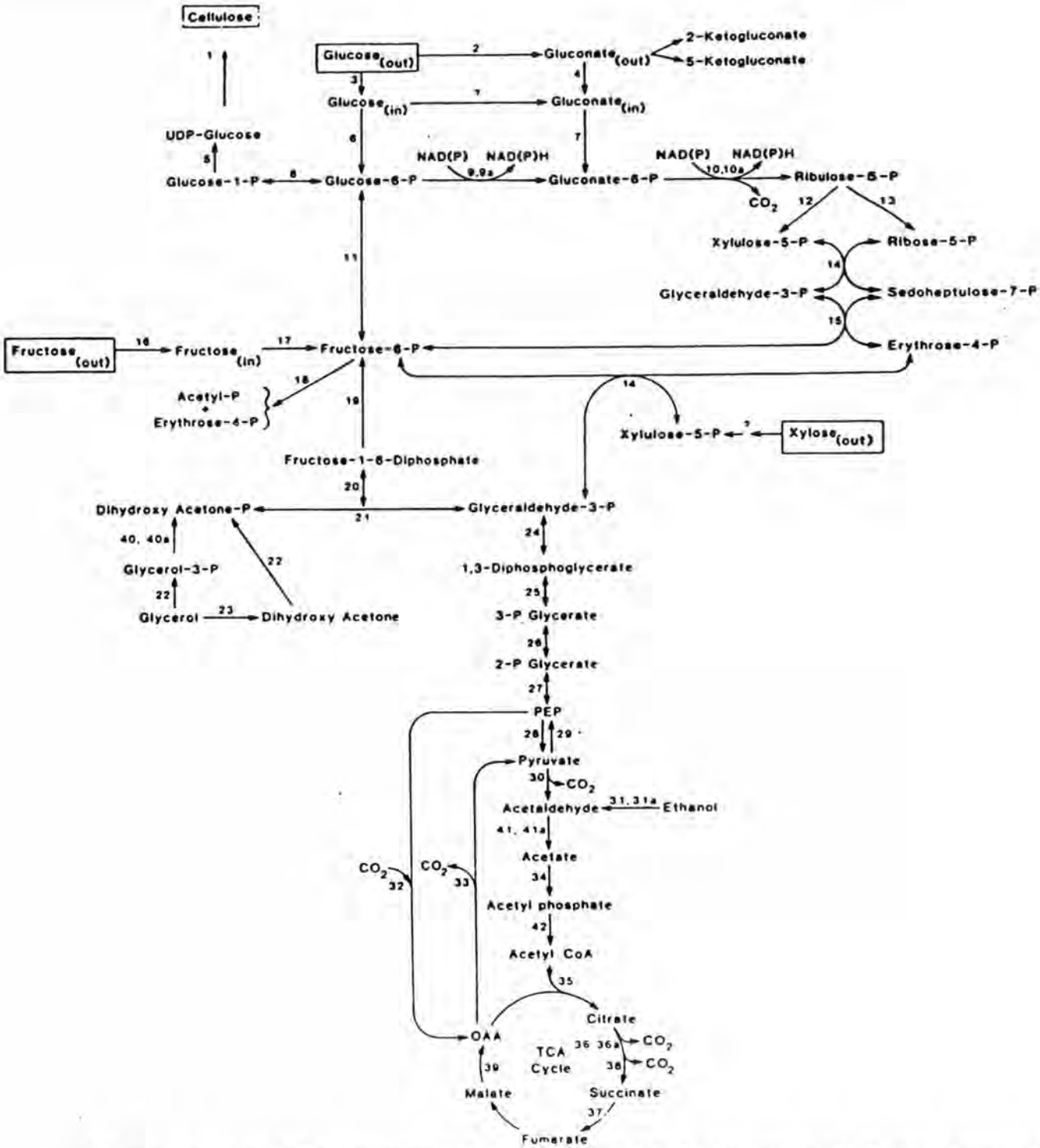
เซลลูโลสในอัตราการผลิตที่ต่ำกว่าได้เรื่อยๆจนถึงวันที่ 46 ของการเลี้ยง (Dudman, 1959; Embuscado, Marks and BeMiller, 1994; Masaoka et al., 1993)

2.4 ชีวเคมีของการผลิตเซลลูโลสโดย *A. xylinum*

A. xylinum สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตเซลลูโลสได้หลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ โพลีแซคคาไรด์เช่น แป้ง น้ำตาลแอลกอฮอล์เช่น แมนนิทอลและอาราบิทอล กลีเซอรอล กลูโคโนแลกโตนและกรดอินทรีย์เช่น กรดซิตริก กรดมาลิกและกรดซัคซินิก โดยสารเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่สามารถเข้าสู่ตอนใดตอนหนึ่งของวิถีเมตาบอลิซึมหลักอันได้แก่ Pentose Phosphate Pathway สำหรับสารตั้งต้นที่เป็นคาร์โบไฮเดรทและ Krebs cycle สำหรับกรดอินทรีย์และสารอนุพันธ์ของกรดอินทรีย์ (Ross, Mayer and Benziman, 1991) ส่วนวิถีไกลโคลิซีสนั้นจะพบได้น้อยมากเนื่องจาก *A. xylinum* มีการทำงานของ phosphofructokinase ที่น้อยมาก (De Ley et al., 1984) อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Tonouchi และคณะ (1996) พบ Phosphotransferase system ใน *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR2001 โดยเชื้อจะใช้น้ำตาลฟรุกโตสโดยการเปลี่ยนให้เป็น fructose-1-phosphate แล้วจึงเปลี่ยนให้เป็น fructose-1,6-diphosphate โดย fructose-1-phosphate kinase นอกจากนี้ *A. xylinum* ยังมีวิถีกลูโคนีโอเจเนซิส (gluconeogenesis) ซึ่งเป็นการสร้างกลูโคสจากสารตั้งต้นที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรท ในที่นี้ได้แก่การเปลี่ยน oxaloacetate ในวัฏจักรเครบ (Kreb's cycle) ให้เป็น pyruvate ใน Embden-Mayerhof Pamas Pathway (Ross et al., 1991) วิถีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรทใน *A. xylinum* แสดงในรูปที่ 1

ในการสร้างเซลลูโลสของเชื้อนั้น กลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate (G6P) โดย glucose hexokinase (GHK) จากนั้นจะเริ่มกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสโดย G6P จะถูกเปลี่ยนเป็น glucose-1-phosphate (G1P) โดย phosphoglucomutase (PGM) และ G1P จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น uridine diphosphate glucose (UDPG) โดย glucose pyrophosphorylase (UGP) จากนั้น UDPG จะถูกนำมาต่อกันเป็นสายของเซลลูโลสหรือ 1,4-β-glucan chain โดยการทำงานของ cellulose synthase บนplasma membraneของ *A. xylinum* แผนภาพแสดงวิถีชีวเคมีของการผลิตเซลลูโลสของ *A. xylinum* แสดงในรูปที่ 2

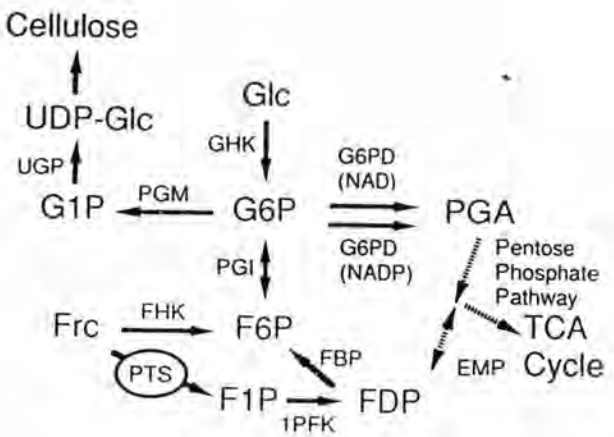
โดยปกติ cellulose synthase จะอยู่ในรูป non-activated cellulose synthase ซึ่งจะถูกกระตุ้นให้ทำงานได้โดย cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) ที่สร้างจาก GTP 2 โมเลกุลโดย diquanylate cyclase อย่างไรก็ตามพบว่า c-di-GMP จะกระตุ้นการทำงานของ cellulose synthase ได้ก็ต่อเมื่อภายในระบบมี Ca^{2+} ion ในปริมาณมากเพียงพอที่จะยับยั้งการทำงานของ phosphodiesterase A (PDE-A) หรือ calcium-sensitive phosphodiesterase ซึ่งจะทำการเปลี่ยน c-di-GMP ให้เป็น pGpG ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น 5' GMP 2 โมเลกุลโดยการทำงานของ phosphodiesterase B (PDE-B) (Ross et al., 1991) ภาพจำลองกลไกการทำงานของ cellulose synthase แสดงในรูปที่ 3



Pathways of carbon metabolism in *A. xylinum*. 1, Cellulose synthase (2, 115); 2, glucose oxidase (60); 3, glucose permease; 4, gluconate permease (19); 5, UDPG-pyrophosphorylase (UTP) (143); 6, glucokinase (ATP) (19); 7, gluconokinase (ATP); 8, phosphoglucomutase (60); 9, glucose-6-P_i-dehydrogenase (NAD); 9a, glucose-6-P_i-dehydrogenase (NADP) (17); 10, 6-phosphogluconate dehydrogenase (NAD); 10a, 6-phosphogluconate dehydrogenase (NADP); 11, phosphoglucoisomerase; 12, phosphoribulose epimerase; 13, phosphoribulose isomerase; 14, transketolase; 15, transaldolase (60); 16, fructose permease; 17, fructokinase (ATP) (19); 18, fructose-6-P_i-phosphoketolase (124); 19, fructose diphosphatase (150); 20, aldolase (11); 21, triose phosphate isomerase (150); 22, glycerol-dihydroxyacetonekinase (ATP) (or glycerol kinase); 23, glycerol oxidase (150); 24, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (NAD); 25, phosphoglycerate kinase (ATP); 26, phosphoglycerate mutase; 27, enolase; 28, pyruvate kinase (10); 29, pyruvate phosphate dikinase (ATP) (14); 30, pyruvate decarboxylase (11); 31, alcohol dehydrogenase (NAD); 31a, alcohol oxidase (138); 32, phosphoenolpyruvate carboxylase (9); 33, oxaloacetate decarboxylase; 34, acetokinase (ATP) (21); 35, citrate synthase (137); 36, isocitrate dehydrogenase (NAD); 36a, isocitrate dehydrogenase (NADP) (138); 37, succinate dehydrogenase (FAD) (15); 38, α-ketoglutarate dehydrogenase (NAD) (coenzyme A) (87); 39, malate dehydrogenase (FAD) (15); 40, glycerol-P_i dehydrogenase (NAD); 40a, glycerol-P_i dehydrogenase (FAD) (150); 41, acetaldehyde dehydrogenase (NAD); 41a, acetaldehyde dehydrogenase (FAD); 42, phosphotransacetylase (11, 60). TCA, Tricarboxylic acid.

รูปที่ 1 วิถีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรทใน *A. xylinum*

ที่มา: Ross และคณะ (1991)

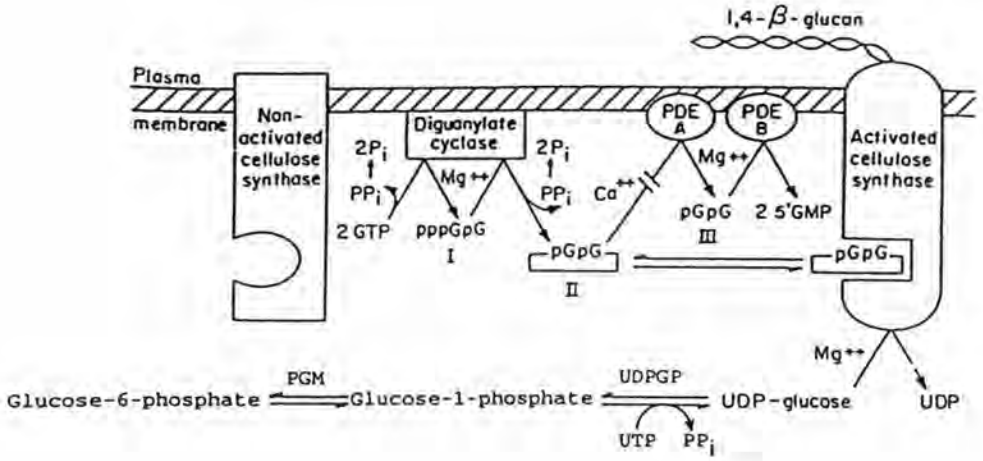


Cellulose Biosynthetic Pathway in *Acetobacter xylinum*.

Glc, glucose; G6P, glucose-6-phosphate; G1P, glucose-1-phosphate; PGA, phosphogluconic acid; Frc, fructose; F1P, fructose-1-phosphate; FDP, fructose-1,6-diphosphate; F6P, fructose-6-phosphate; GHK, glucose hexokinase; PGM, phosphoglucomutase; UGP, UDP-glucose pyrophosphorylase; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PGI, phosphoglucose isomerase; FHK, fructose hexokinase; 1PFk, fructose-1-phosphate kinase; FBP, fructose bis-phosphatase; PTS, phosphotransferase system; EMP, Embden Myerhoff pathway.

รูปที่ 2 วิถีชีวเคมีของการผลิตเซลลูโลสของ *A. xylinum*

ที่มา: Yoshinaga, Tonouchi และ Watanabe (1997)



รูปที่ 3 ภาพจำลองกลไกการทำงานของ cellulose synthase

ที่มา: Ross และคณะ (1987)

2.5 ลักษณะทางกายภาพของเซลลูโลสและโครงสร้างของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่สร้างโดย *A. xylinum*

จากการศึกษาfreeze fractureภายใต้ผนังเซลล์ด้านนอก(outer membrane) ของ *A. xylinum* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องทะลุผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) พบแถวของเทอร์มินัลคอมเพล็กซ์ (Terminal Complex, TC) ที่เป็นรูเปิดขนาดประมาณ 3.5 นาโนเมตร เรียงขนานไปกับแกนสมมาตรตามยาวของเซลล์ (Brown, Willison, and Richardson, 1976; Zaar, 1979) ดังแสดงในรูปที่ 4 และ 5 ในกระบวนการสร้างเซลลูโลสของ *A. xylinum* สายของ 1,4-β-glucan จะถูกสังเคราะห์โดย catalytic site ที่อยู่ในชั้นของไซโตพลาสมิกเมมเบรน (cytoplasmic membrane) ดังแสดงในรูปที่ 6 จากการศึกษาโดย molecular modeling ต่อมา Cousins และ Brown (1995 cited in Brown, 1996) เสนอว่าในขั้นแรกนั้นสายของ 1,4-β-glucan จำนวน 4 สายจะรวมกันเกิดเป็น single mini-sheet โดยอาศัยแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) จากนั้น mini-sheet จำนวน 4 สายที่อยู่ภายใน terminal-subunit (TC-subunit) เดียวกันจะรวมกันเป็นสายของ mini-crystal หรือ sub-elemental fibril ดังแสดงในรูปที่ 7 โดยสายของ sub-elemental fibril ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.5 นาโนเมตรจะถูกขับออกมาจากรูของ TC-subunit ใน *A. xylinum* นั้น TC จะมีลักษณะการเรียงเป็นเส้นตรง โดยแต่ละ TC จะประกอบด้วย 3 TC-subunit ที่เรียงอยู่ชิดกันดังรูปที่ 7 สายของ sub-elemental fibril 3 สายจะรวมกันในลักษณะของเกลียวขวนซ้าย (Ruben and Bokelman, 1987. cited in Legge, 1990: 307; Zaar, 1977. cited in Yoshinaga, Tonouchi and Watanabe, 1997: 221) เกิดเป็นสายของ crystalline microfibril ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-4 นาโนเมตร จากนั้นสายของไมโครไฟบริล 50-100 สายจะรวมกันเกิดเป็นสายของเส้นใยเซลลูโลสที่มีรูปร่างเหมือนริบบิ้น (ribbon-shaped fibril) ที่มีความกว้างประมาณ 60-80 นาโนเมตรและมีความหนาประมาณ 3-4 นาโนเมตร (Brown et al., 1976; Zaar, 1977. cited in Yoshinaga et al., 1997: 221)

จากการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยเซลลูโลสที่สร้างจาก *A. xylinum* กับเส้นใยเซลลูโลสจากแหล่งอื่นๆดังแสดงในรูปที่ 8 พบว่าเส้นใยเซลลูโลสที่สังเคราะห์จาก *A. xylinum* มีขนาดเส้นใยเล็กกว่าประมาณ 100-1,000 เท่า (Yoshinaga et al., 1997) นอกจากนี้เส้นใยเซลลูโลสที่ได้จาก *A. xylinum* ยังมีการแตกกิ่งก้านแบบ 3-way branching points ตลอดความยาว โดยการแตกกิ่งของไฟบริลเกิดจากการแบ่งเซลล์ในการเจริญของแบคทีเรีย (Yamanaka et al.,1989) ดังรูปที่ 9 และความยาวของสายไฟบริลที่อยู่ระหว่างจุดที่เกิดการแตกกิ่งหรือ segment จะมีค่าอยู่ในช่วง 180-960 นาโนเมตร (Watanabe and Yamanaka, 1995) จากการหาค่า degree of polymerization (DP) โดยการวัดความหนืด (viscometric method) พบว่าเซลลูโลสที่ *A. xylinum* สร้างมีค่า DP อยู่ในช่วง 2,190-3,470 (Marx-Figini, 1982 cited in Legge, 1990)

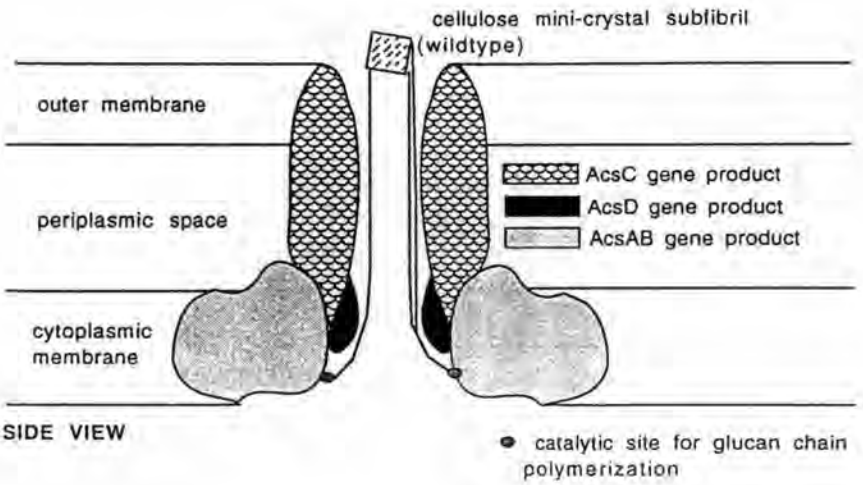
ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพการหมักแบบวางนิ่งในรูปที่ 10 แสดงลักษณะการสานกันเป็นร่างแหของเส้นใยเซลลูโลสและเซลล์แบคทีเรียซึ่งมีความยาวประมาณ 1.5 ไมครอนที่แทรก

รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ P-fracture force ของ lipopolysacchande membrane (PF) และ outer surface (ES) ของเซลล์แบคทีเรีย *A. xylinum* แสดงลักษณะการเรียงเป็นเส้นตรงของ TC ขนานไปกับแกนสมมาตรตามยาวของเซลล์

ที่มา: Zaar (1979)

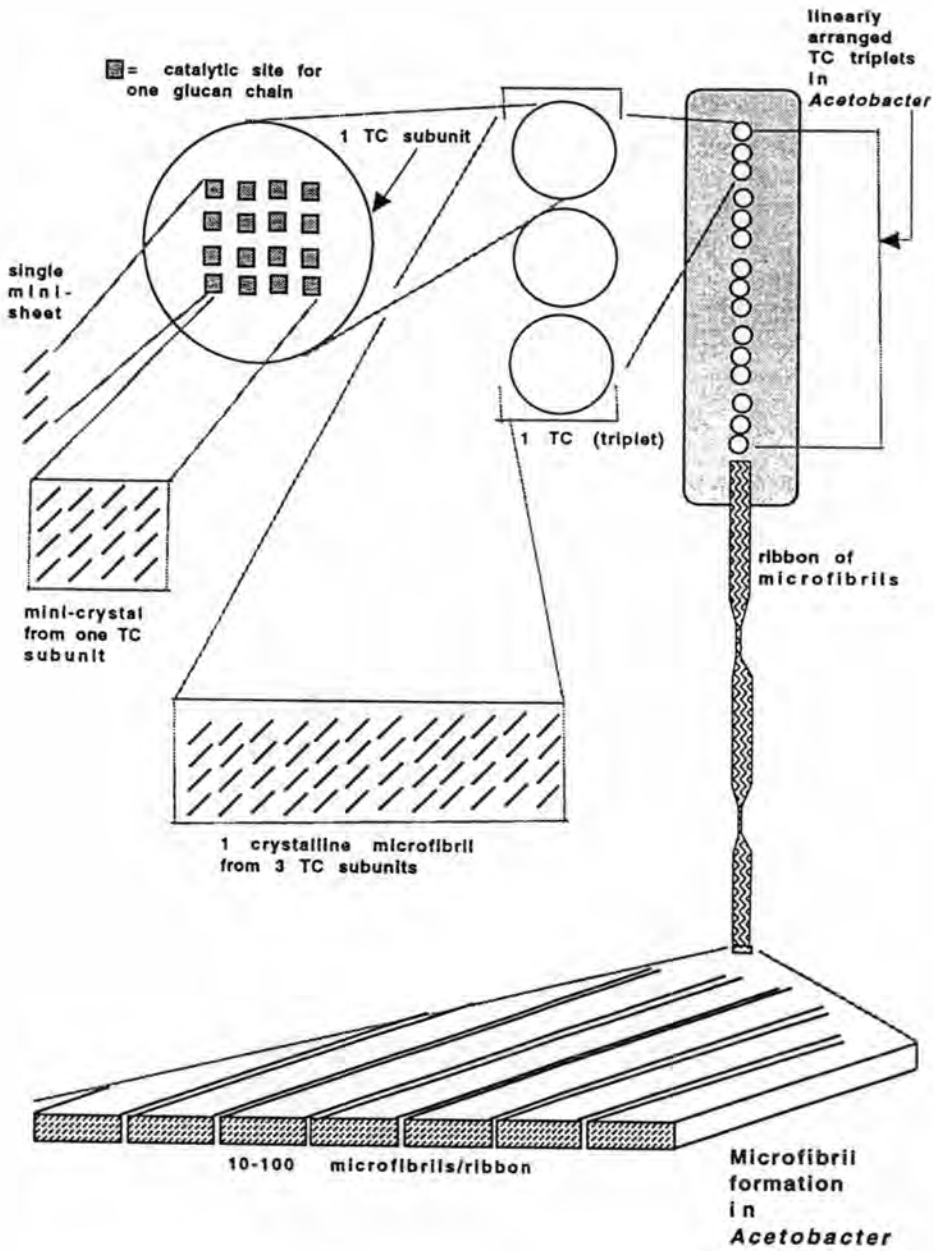
รูปที่ 5 ภาพจำลองแสดงรูปแบบการเรียงของ TC และการรวมตัวของสายเซลลูโลสที่สร้างจาก *A. xylinum*

ที่มา: Yoshinaga และคณะ (1997)



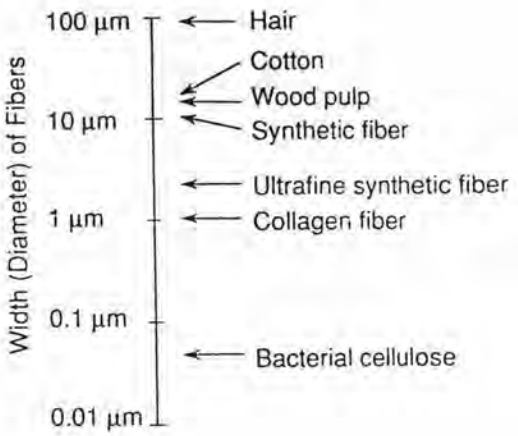
รูปที่ 6 ภาพจำลองแสดง cellulose-synthesizing complex ของ *A. xylinum*

ที่มา: Brown (1996)



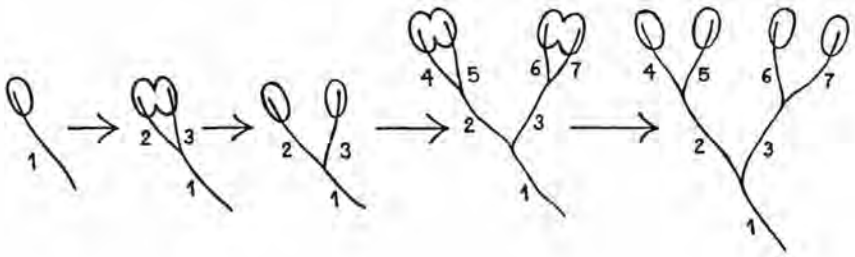
รูปที่ 7 ภาพจำลองการสร้างเส้นใยเซลลูโลสของ *A. xylinum*

ที่มา: Brown (1996)



รูปที่ 8 เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยเซลลูโลสที่สร้างจาก *A. xylinum* กับเส้นใยธรรมชาติและเส้นใยสังเคราะห์อื่นๆ

ที่มา: Yoshinaga และคณะ (1997)



รูปที่ 9 ภาพจำลองการแตกกิ่งของเส้นใยเซลลูโลสแบบ 3-way branching points ซึ่งเกิดจากการแบ่งเซลล์ของ *A. xylinum*

ดัดแปลงจาก: Yamanaka และคณะ (1989)

อยู่ในร่างแหเซลลูโลส ในปี 1992 Okiyama, Motoki และ Yamanaka ซึ่งทำการศึกษาลักษณะโครงสร้างของแผ่นวุ้นเซลลูโลสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าร่างแหเซลลูโลสดังกล่าวเกิดจากการสานกันของเส้นใยเซลลูโลสที่มีขนาดประมาณ 20-100 นาโนเมตรเกิดเป็นโพรงขนาดเล็ก (capillaries) ที่มีขนาดประมาณ 0.5-1.0 ไมครอนจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yamanaka และคณะในปี 1989 ซึ่งทำการศึกษาลักษณะโครงสร้างของแผ่นวุ้นเซลลูโลสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเช่นเดียวกันและพบว่าแผ่นวุ้นเซลลูโลสเกิดมาจากการซ้อนทับกันเป็นชั้นๆของร่างแหเซลลูโลสบางๆจำนวนมากดังแสดงในรูปที่ 11 จึงเกิดเป็นรูและโพรงขนาดเล็กจำนวนมากในโครงสร้าง โดยรูและโพรงเล็กๆเหล่านี้เองที่ทำให้แผ่นวุ้นสามารถกักเก็บน้ำไว้ในโครงสร้างได้มากกว่า 100 เท่าของน้ำหนักแห้ง (Thompson et al.,1988. cited in White and Brown,1989)

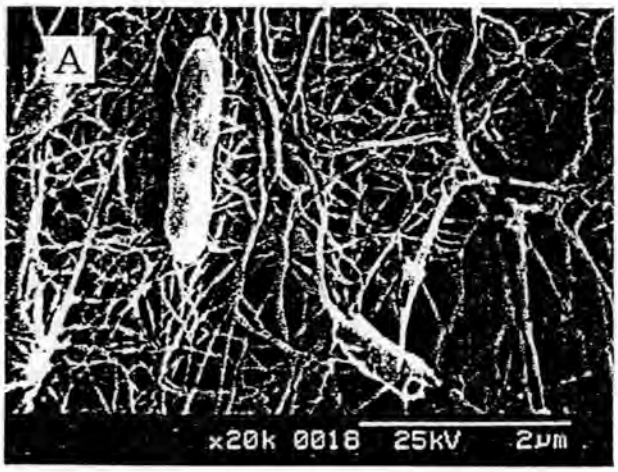
Okiyama, Motoki และ Yamanaka (1992) ได้ทำการศึกษาปริมาณน้ำในแผ่นวุ้นโดย broad-line pulsed NMR และพบว่าแผ่นวุ้นเซลลูโลสประกอบด้วยเซลลูโลส 0.9% ในขณะที่มีองค์ประกอบที่เป็นน้ำอยู่ถึง 99.1% โดยน้ำที่อยู่ในแผ่นวุ้นแบ่งออกเป็น bound water 0.3% และ free water 98.8% นอกจากนี้เมื่อทำการวัดค่า %syneresis ซึ่งแสดงถึงปริมาณน้ำที่เจลสูญเสียออกมาจากโครงสร้างหลังจากการเซนตริฟิวจ์ พบว่าแผ่นวุ้นเซลลูโลสมีค่าของ %syneresis สูงกว่าเจลของ agar และ gelatin ถึง 27 และ 90 เท่าตามลำดับ ค่าของ free water และ %syneresis ที่สูงมากบ่งบอกว่าน้ำที่อยู่ในแผ่นวุ้นเซลลูโลสเพียงแต่ถูกกักเก็บไว้ในโครงสร้างที่เป็นรูโพรงขนาดเล็กโดย capillary action และสามารถสูญเสียออกมาได้ง่าย

2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวของ *A. xylinum*

การผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวให้ได้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี คือมีลักษณะเนื้อที่เนียนนุ่มและเหนียวพอเหมาะ ไม่เป็นกากใย อาศัยปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆดังต่อไปนี้ (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และคณะ; ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, 2527 อ้างถึงใน สุภาพร โชคณาโรจน์วงศ์, 2535; สมคิด ธรรมรัตน์, 2531; สมศรี ลิปิพัฒนวิทย์, 2531; วราวุฒิ ครูส่ง, 2539; Alaban, 1962)

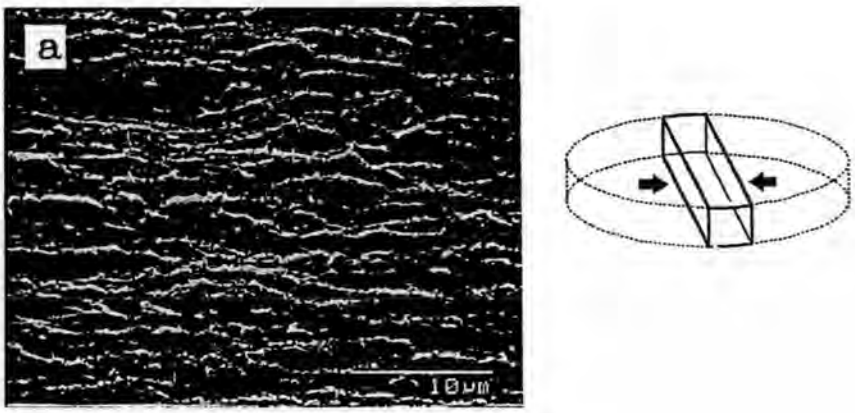
2.6.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรียและคุณภาพของหัวเชื้อที่ใช้ในการหมัก

A. xylinum เป็นแบคทีเรียในสกุล *Acetobacter* ซึ่งมีความสามารถในการสร้างกรดอะซีติกหรือกรดน้ำส้มสายชูได้ดี ดังนั้นในการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวให้ได้ผลจะต้องเลือกใช้หัวเชื้อสายพันธุ์ดีที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้สูงในระยะเวลาสั้น และสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซีติก กรดกลูโคนิกในปริมาณต่ำ นอกจากนี้เชื้อที่ใช้ควรจะมีความเสถียรหรือให้ผลผลิตในปริมาณสูงอย่างสม่ำเสมอ ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมได้ดีและสามารถใช้น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกได้ แม้ว่าจะเป็นที่ยอมรับในแวดวงของผู้ผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวในทางการค้าว่าเชื้อที่



รูปที่ 10 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงร่างแหเซลลูโลสของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่สร้างโดย *A. xylinum*

ที่มา: Yoshinaga และคณะ (1997)



รูปที่ 11 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดง fracture edge ของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่สร้างโดย *A. xylinum*

ที่มา: Yamanaka และคณะ (1989)

สายพันธุ์ต่างกันจะให้แผ่นวุ้นที่มีลักษณะคุณภาพและเนื้อสัมผัสแตกต่างกัน แต่ยังไม่มีงานวิจัยที่รายงานผลดังกล่าวในรูปของข้อมูลที่เป็นตัวเลขที่เชื่อถือได้แต่อย่างใด

คุณภาพของหัวเชื้ออันได้แก่ ความบริสุทธิ์ของหัวเชื้อและความสามารถในการผลิตแผ่นวุ้นเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อผลผลิตที่ได้เป็นอันมาก และเนื่องจาก *A. xylinum* มีการกลายพันธุ์ที่ทำให้ความสามารถในการผลิตลดลงเกิดขึ้นได้ง่าย ดังนั้นผู้ผลิตจะต้องทำการคัดเลือกและแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อยู่เสมอในระหว่างการเก็บถ่ายเชื้อ (สมคิด ธรรมรัตน์, 2541)

2.6.2 ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น

การผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวให้ได้ผลดีนอกจากควรใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกว่าเหมาะสมแล้วปริมาณเชื้อที่ใช้จะต้องมีมากพอ เพื่อให้เชื้อเจริญได้อย่างรวดเร็วจนมีปริมาณมากเกินกว่าเชื้ออื่นๆที่อาจติดมากับน้ำมะพร้าวหรือการปนเปื้อนในระหว่างการหมัก โดยปริมาณเชื้อที่เหมาะสมซึ่งจะให้ผลผลิตสูงที่สุดนั้นอยู่ในช่วงร้อยละ 10-20 ถ้าใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นมากกว่านี้จะทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง (Alaban, 1962)

2.6.3 น้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวที่ใช้ควรมาจากมะพร้าวแก่ เนื่องจากเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมที่หาได้ง่ายและมีคุณค่าสูงเหมาะสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย (Alaban, 1962) โดยเลือกน้ำมะพร้าวที่สดและใหม่ มีไขมันน้อย ไม่มีการปนเปื้อนของน้ำมะพร้าวที่เน่าเสีย ก่อนใช้ต้องนำมาต้มให้เดือดให้ไขมันละลายและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปะปนมา ขณะเดือดควรช้อนเอาฟองและไขมันที่ผิวหน้าทิ้งไป (สมคิด ธรรมรัตน์, 2531) และไม่ควรเจือจางน้ำมะพร้าวเนื่องจากจะทำให้ได้ผลผลิตน้อยลง (Alaban, 1962)

2.6.4 แหล่งคาร์บอน

A. xylinum สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ น้ำตาลเชิงซ้อน แอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ (Masaoka et al., 1993) แม้ว่าน้ำมะพร้าวแก่จะมีน้ำตาลซึ่งส่วนมากเป็นน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสอยู่ถึง 3% แต่เนื่องจากปริมาณน้ำตาลดังกล่าวในน้ำมะพร้าวไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และความอ่อน-แก่ของมะพร้าว ดังนั้นจึงต้องทำการเติมน้ำตาลลงในน้ำมะพร้าว เพื่อให้แน่ใจว่ามีปริมาณคาร์บอนมากพอสำหรับการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นของเชื้อ (วราวุฒิ ครูส่ง, 2539) เนื่องจากซูโครสเป็นน้ำตาลที่หาง่ายและมีราคาถูก อีกทั้งแผ่นวุ้นที่ได้หนาและเนื้อแน่น ดังนั้นในการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวจึงนิยมใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณน้ำตาลซูโครสที่

เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-8% ซึ่งให้ความหนาของแผ่นวุ้นสูงที่สุดและให้ผลคุ้มค่าในทางการค้า ถ้าใช้น้ำตาลน้อยกว่า 5% จะทำให้เนื้อวุ้นน้ำมะพร้าวที่ได้นิ่ม แต่ถ้าใช้ปริมาณน้ำตาลสูงกว่านี้จะมีน้ำตาลเหลือใช้มาก ทำให้สิ้นเปลืองและมีน้ำตาลเหลือในน้ำทิ้งมาก ทำให้ยากแก่การบำบัด (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และคณะ; สมคิด ธรรมรัตน์, 2531; สมศรี ลิปิพัฒนวิทย์, 2531; วราวุฒิ ครูส่ง, 2539; Alaban, 1962)

2.6.5 แหล่งไนโตรเจน

ตามธรรมชาติแล้วน้ำมะพร้าวมีสารประกอบไนโตรเจนในรูปของโปรตีนอยู่ประมาณร้อยละ 0.4 (วราวุฒิ ครูส่ง, 2539) ซึ่งจะช่วยให้ *A. xylinum* เจริญและสร้างแผ่นวุ้นได้แม้จะไม่เติมไนโตรเจนเพิ่มลงไปก็ตาม อย่างไรก็ตามการเติมสารประกอบไนโตรเจนเพิ่มเติมจะช่วยเร่งให้เชื้อผลิตแผ่นวุ้นได้หนาในเวลาสั้นและช่วยให้เชื้อเจริญได้ดี โดยสารประกอบไนโตรเจนที่ใช้ได้ดีที่สุดคือ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$) และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) รองลงมาคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แต่เนื่องจากไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตละลายยาก ดังนั้นแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตจึงเหมาะสมกว่า โดยปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.05-0.1% อย่างไรก็ตามผู้ผลิตในอุตสาหกรรมวุ้นน้ำมะพร้าวนิยมใช้แอมโมเนียมซัลเฟตมากกว่าเนื่องจากมีราคาถูก (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, 2527 อ้างถึงใน สุภาพร โชคณาโรจน์วงศ์, 2535; สมคิด ธรรมรัตน์, 2531; สมศรี ลิปิพัฒนวิทย์, 2531; Alaban, 1962; Budhiono et al., 1999)

2.6.6 สารประกอบแมกนีเซียม

แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) สามารถกระตุ้นให้ *A. xylinum* ผลิตแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้ดีขึ้น (Fontana et al., 1997) โดยชนิดและปริมาณของสารประกอบแมกนีเซียมที่เหมาะสม คือ แมกนีเซียมซัลเฟต ($Mg_2SO_4.7H_2O$) ที่ความเข้มข้น 0.05% (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, 2527 อ้างถึงใน สุภาพร โชคณาโรจน์วงศ์, 2535; สมศรี ลิปิพัฒนวิทย์, 2531; Alaban, 1962)

2.6.7 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย แม้ว่า *A. xylinum* สามารถเจริญได้ในช่วง pH 3.5-7.5 แต่ pH ที่เหมาะสมต่อการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสจะอยู่ในช่วง 4.5-6.0 (Alaban, 1962; Lapuz et al., 1967; Masaoka et al., 1993) นอกจากนี้การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างโดยการใช้กรด เช่น กรดอะซีติก ยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จากรายงานของ Alaban (1962) พบว่าการเติมกรดอะซีติก

ร้อยละ 1 ช่วยป้องกันการปนเปื้อนจาก *Aspergillus* sp. ได้และเมื่อเพิ่มปริมาณเป็นร้อยละ 2 จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนจาก *Pennicillium* sp. และ *Bacillus* sp. ได้

ในระหว่างการหมักนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ใช้เลี้ยงจะลดลงเรื่อยๆเนื่องจากกรดกลูโคนิกที่เชื้อสร้างขึ้น เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้น เชื้อจะผลิตกรดกลูโคนิกมากขึ้นและส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลงมาก แม้ว่าการเติมกรดกลูโคนิกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ แต่การที่เชื้อเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิกจะทำให้มีสารตั้งต้นสำหรับการสร้างเซลลูโลสน้อยลง (Masaoka et al., 1993)

2.6.8 อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวอยู่ในช่วง 28-32 องศาเซลเซียส เนื่องจากการสร้างแผ่นวุ้นสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเชื้อเป็นอย่างมาก ดังนั้นการสร้างแผ่นวุ้นจะเกิดได้เร็วเมื่อเชื้อเจริญได้ดี อุณหภูมิที่ต่ำกว่าหรือสูงกว่าช่วงนี้มากๆซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจะทำให้แผ่นวุ้นที่ได้บางและนิ่ม โดยเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียสและสูงกว่าหรือเท่ากับ 35 องศาเซลเซียสการสร้างแผ่นวุ้นจะไม่เกิดขึ้นเลย (Alaban, 1962; Lapuz et al., 1967)

2.6.9 ออกซิเจน

เนื่องจาก *A. xylinum* ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ดังนั้นการหมักเพื่อให้เชื้อเจริญและสร้างแผ่นวุ้นได้ดีจึงต้องหมักในภาชนะที่มีผิวหน้ากว้างเพื่อให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสของอากาศกับอาหารเลี้ยงเชื้อมากๆ นอกจากนี้ควรใช้วัสดุที่มีการระบายอากาศได้ดี เช่น กระดาษหนังสือพิมพ์หรือผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้วปิดปากภาชนะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนในระหว่างการหมัก (สมคิด ธรรมรัตน์, 2531)

2.7 อิทธิพลของปัจจัยในการเลี้ยงต่อสมบัติของเซลลูโลสที่สร้างโดย *A. xylinum*

ลักษณะของเซลลูโลสและแผ่นวุ้นที่สร้างจาก *A. xylinum* ขึ้นกับปัจจัยในการเลี้ยงหลายประการ ดังนี้

2.7.1 สายพันธุ์ของเชื้อ

สายพันธุ์ของ *Acetobacter* ที่ใช้ในการหมักนอกจากจะมีอิทธิพลต่อปริมาณผลผลิตหรือความหนาและน้ำหนักเปียกของแผ่นวุ้นแล้ว ยังส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบของแผ่นวุ้นอีกด้วย ดังเช่นในงานวิจัยของ Alaban (1962) ซึ่งพบว่าแผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวที่สร้างจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆมีลักษณะเนื้อสัมผัสต่างกันคือ เชื้อบางสายพันธุ์จะสร้างแผ่นวุ้นที่หนาแต่ไม่เหนียวและขาดเป็นชิ้นเมื่อยกขึ้นจากอาหารที่ใช้เลี้ยง (flabby nata) ในขณะที่เชื้อบางสายพันธุ์จะสร้างแผ่นวุ้นที่หนาและเนื้อแน่น (firm nata) เช่นเดียวกับไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก (2527) และ Jesus, Andres and Magno (1971. cited in Okiyama, Motoki and Yamanaka, 1992) ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากผลไม้และพบว่า เชื้อบางสายพันธุ์แม้ว่าจะให้แผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวที่หนามากแต่เนื้อวุ้นมีลักษณะยุ่ยและขาดง่าย เมื่อนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์วุ้นน้ำมะพร้าวเชื่อมจะได้ผลิตภัณฑ์ที่ยุ่ยและมีกากมาก ทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

ต่อมาในปี 1997 Toda และคณะ พบว่า *A. xylinum* สายพันธุ์ DA ที่แยกได้จากกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูมีความสามารถในการผลิตเซลลูโลสเพิ่มเป็น 4 เท่าเมื่อเติมกรดอะซีติกในอาหาร Glucose-Peptone-Yeast extract (GPY medium) ในปริมาณ 2% โดยแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่ได้นอกจากจะมีเนื้อสัมผัสนิ่มกว่าแผ่นวุ้นที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์อื่นแล้วยังมีค่าของ water content per unit dry weight of cellulose ของแผ่นวุ้นสูงถึง 150 g-water/ g-cellulose ซึ่งคิดเป็น 2 เท่าของค่าที่ได้จากแผ่นวุ้นที่ผลิตโดยเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ (60-80 g-water/ g-cellulose) แสดงว่าแผ่นวุ้นที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ DA มีความสามารถในการกักเก็บน้ำไว้ในโครงสร้างสูงกว่าเมื่อเทียบกับแผ่นวุ้นที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ

นอกจากสายพันธุ์ของเชื้อจะมีผลต่อลักษณะของแผ่นวุ้นเซลลูโลสแล้ว ยังส่งผลต่อสมบัติของเซลลูโลสที่ผลิตได้ดังนี้ Einfeldt และ Klemm (1997) พบว่า Degree of polymerization (DP) ของเซลลูโลสซึ่งเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยงนั้นมีอัตราการเพิ่มไม่เท่ากันในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ อีกทั้งการใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่อยู่ในระยะ stationary phase จะทำให้ได้เซลลูโลสที่มีค่า DP สูงกว่าการใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่อยู่ในระยะ log phase ต่อมาในปี 1998 Watanabe และคณะพบว่า *Acetobacter* BPR3001A ซึ่งเป็น mutant ที่ได้จากสายพันธุ์ BPR2001 และมีการสร้างโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้หรือ acetan ลดลงนั้น แม้ว่าจะมีลักษณะสันฐานวิทยาของเซลล์ ลักษณะทางกายภาพ ขนาดของเส้นใยเซลลูโลสและลักษณะการสานกันของร่างแหเซลลูโลสที่ไม่แตกต่างจาก BPR2001 แต่เซลลูโลสที่สร้างจาก BPR3001A นั้นมีค่า DP และ %Crystallinity สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะเดียวกันเซลลูโลสที่ได้ยังมี

ขนาดของ crystallite size ใหญ่กว่าอีกด้วย ทั้งนี้เนื่องมาจาก acetan ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มี backbone เป็นสายของ β–1,4-glucose นั้นสามารถขัดขวางการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายไมโครไฟบริลของเซลลูโลสได้โดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับเซลลูโลสเสียเอง เช่นเดียวกับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสซึ่งสามารถขัดขวางการรวมกันของสายไมโครไฟบริลของเซลลูโลสได้ (Yamamoto, Horii and Hirai, 1996. cited in Watanabe et al., 1998) ดังนั้น BPR3001A ซึ่งผลิต acetan น้อยลงจึงเกิดการรวมกันของเซลลูโลสไฟบริลด้วยพันธะไฮโดรเจนได้ดีกว่า ซึ่งน่าจะส่งผลให้ขนาดของ crystallite size และค่า %Crystallinity ของเซลลูโลสมีค่าสูงขึ้น นอกจากนี้เนื่องจากค่า Young's modulus ของแผ่นชีทแปรผันโดยตรงต่อค่า crystallinity ของเซลลูโลส ดังนั้นแผ่นชีทเซลลูโลสที่ได้จาก BPR3001A จึงมีค่า Young's modulus สูงกว่าเมื่อเทียบกับ BPR2001

แม้ว่างานวิจัยที่ผ่านๆมาซึ่งทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเส้นใยเซลลูโลสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะแสดงว่าลักษณะทางกายภาพอันได้แก่ความกว้างและความหนาของเส้นใยเซลลูโลสที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆนั้นไม่มีความแตกต่างกันก็ตาม (Brown et al.,1976; Zaar, 1977; Yamanaka and Watanabe, 1989; Watanabe and Yamanaka, 1995) แต่งานวิจัยของ Yamanaka, Ishihara and Sugiyama (2000) ซึ่งทำการเติมสารแอนติไบโอติกและรีดิวซิ่งเอเจนต์เพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในด้านสันฐานวิทยาของเชื้อนั้นกลับพบว่า การเปลี่ยนแปลงขนาดในด้านความยาวของเซลล์นั้นจะส่งผลต่อขนาดของเส้นใยเซลลูโลสที่เชื้อสร้าง โดยการเติม 0.1 mM nalidixic acid และ 0.3 mM chloramphenicol จะส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียมีความยาวเพิ่มขึ้นเป็น 2.4 และ 4.7 เท่าตามลำดับ ในขณะที่ความกว้างของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อวัดขนาดของเส้นใยด้วย Atomic Force Microscope (AFM) พบว่าเส้นใยเซลลูโลสที่เชื้อดังกล่าวสร้างมีความกว้างเพิ่มขึ้นเป็น 1.2 และ 1.9 เท่าตามลำดับ สันนิษฐานว่าเกิดเนื่องมาจากสารแอนติไบโอติกดังกล่าวส่งผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเชื้อจึงทำให้เซลล์มีความยาวมากขึ้น (elongation) ดังนั้นจำนวนของ Terminal Complex (TC) ที่มากขึ้นจึงส่งผลให้เส้นใยที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเส้นใยเซลลูโลสที่มีขนาดใหญ่ขึ้นนั้นเกิดเนื่องมากจากการ crystallization ของสายเซลลูโลสที่กว้างผิดปรกติหรือเกิดจากการรวมกลุ่มกันของสายเซลลูโลสขนาดปรกติจำนวนมาก ในทางตรงกันข้ามการเติม 1.0 mM dithiothreitol จะทำให้เซลล์มีความยาวลดลงเหลือเพียง 60% ของชุดควบคุม ซึ่งน่าจะส่งผลให้จำนวน TC บนเซลล์แบคทีเรียลดลงและทำให้เส้นใยที่ได้มีขนาดเล็กลงด้วย อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์ดังกล่าวไม่มีผลต่อความหนาของเส้นใยเซลลูโลสและความหนาของแผ่นวุ้นเซลลูโลสแต่อย่างใด ขนาดของเส้นใยเซลลูโลสที่ใหญ่ขึ้นยังส่งผลให้แผ่นชีทที่ได้จากการทำแผ่นวุ้นเซลลูโลสให้แห้งมีค่า Young's Modulus สูงขึ้นถึง 34-42% แม้ว่าเส้นใยที่มีขนาดเล็กกว่าชุดควบคุมจะให้แผ่นชีทที่มีค่า Young's Modulus ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมก็ตาม ค่าเฉลี่ยต่างๆแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอิทธิพลของสารเคมีชนิดต่างๆต่อความยาวของเซลล์ *A. xylinum*, ความกว้างของเส้นใยเซลลูโลสที่เชื้อสร้างและค่า Young's Modulus ของแผ่นซีทที่ได้

Chemical reagent	Concentration (mM)	Average Length of cell (micron)	Average Width of cellulose ribbon (micron)	Young's Modulus (GPa)
Control	0	6.4	117	13.7
Nalidixic acid	0.1	17	142	19.4
Chloramphenicol	0.3	30	228	18.4
Dithiothreitol	1.0	3.8	53	14.1

ที่มา : Yamanaka และคณะ (2000).

2.7.2 แหล่งคาร์บอน

เนื่องจาก *A. xylinum* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ดังนั้นจึงมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาถึงอิทธิพลของชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่อการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ อย่างไรก็ตามงานวิจัยส่วนใหญ่จะศึกษาในแง่ของปริมาณของแผ่นวุ้นและเซลลูโลสที่ได้มากกว่าลักษณะทางกายภาพของแผ่นวุ้นและเซลลูโลส

Alaban (1962) ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ N-108 ในอาหารน้ำมะพร้าวที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนและทำการแปรชนิดของแหล่งคาร์บอนโดยใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อจะสร้างแผ่นวุ้นที่หนาเมื่อใช้น้ำตาลซูโครส กลูโคสและแลกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่เมื่อใช้น้ำตาลอาราบิโนสนั้นเชื้อจะสร้างแผ่นวุ้นบางๆหรือไม่สร้างแผ่นวุ้นเลย นอกจากนี้เมื่อทำการแปรปริมาณของน้ำตาลซูโครสที่เติมลงในอาหารน้ำมะพร้าวตั้งแต่ 0-10% Alaban พบว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหารสูงขึ้นแต่ไม่เกิน 8% แผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวที่ได้จะมีความหนาและน้ำหนักเปียกสูงขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมนั้นอยู่ในช่วง 5-8% ซึ่งเชื้อจะสร้างแผ่นวุ้นที่หนาและเนื้อแน่น ในขณะที่การใช้ปริมาณน้ำตาลที่ต่ำกว่า 5% นั้น แม้ว่าแผ่นวุ้นที่ได้จะหนาแต่เนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้นจะนิ่มและขาดง่าย (soft and flabby) ในทางตรงกันข้ามเมื่อปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 10% แผ่นวุ้นที่ได้มีความหนาและน้ำหนักเปียกต่ำที่สุด แต่เนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้นจะแข็งและเหนียว (tough) ผลของปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เติมในอาหารน้ำมะพร้าวต่อความหนาของแผ่นวุ้นเปรียบเทียบกับผลจากงานวิจัยอื่นๆแสดงดังตารางที่ 2

ต่อมา Lapuz และคณะ (1967) ศึกษาการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Yeast extract-Peptone-Salt solution ที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ผลการทดลองแสดงว่า *A. xylinum* สามารถสร้างแผ่นวุ้นได้ดีหรือให้แผ่นวุ้นที่หนาและเนื้อแน่น เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่จะสร้างแผ่นวุ้นที่บางและนิ่มเมื่อใช้น้ำตาลกาแลกโตส แลกโตส และมอลโตสเป็นแหล่ง

ตารางที่ 2 ผลของปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เติมในอาหารน้ำมะพร้าวต่อความหนาของแผ่นวุ้นเซลลูโลส ในงานวิจัยอื่นๆ

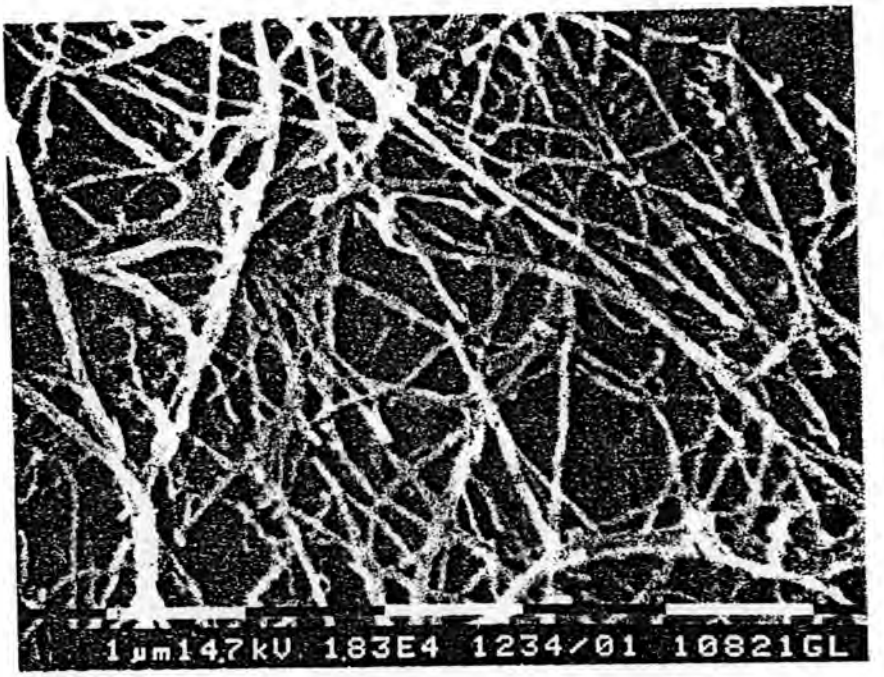
ปริมาณน้ำตาลซูโครส (%)	ความหนา (มม)		
	Alaban (1962)	ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก (2527)	สมศรี ลิปิพัฒนวิทย์ (2531)
0	17.5	18.2	10.0
5	24.5	15.5	19.0
10	15.5	14.3	13.0

คาร์บอน ในปี 1999 Budhiono และคณะพบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสในอาหารน้ำมะพร้าวในช่วง 1-4% ไม่มีผลต่อความหนา น้ำหนักเปียก น้ำหนักแห้งและ %Solid contentของแผ่นวุ้น รวมถึงปริมาณเซลลูโลสที่ได้แต่อย่างใด นอกจากนี้แม้ว่าการเติมน้ำตาลซูโครสในอาหารน้ำมะพร้าวจะไม่มีผลต่อความหนาและน้ำหนักเปียกของแผ่นวุ้น แต่แผ่นวุ้นที่ได้จะมีน้ำหนักแห้งและ %Solid content เพิ่มขึ้น ในขณะเดียวกันปริมาณเซลลูโลสที่ได้ก็เพิ่มขึ้นด้วย

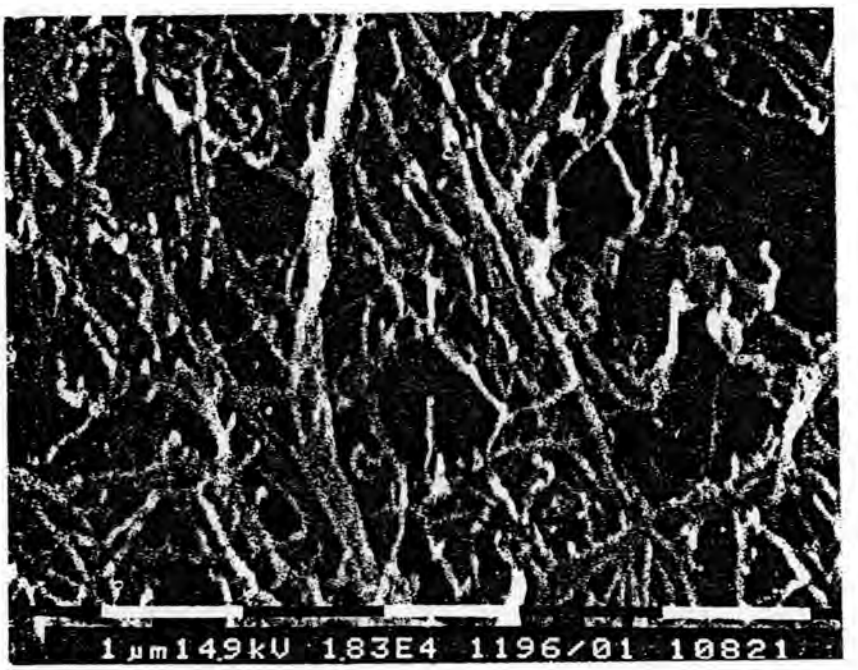
ในปี 1989 Romano และคณะ ทำการศึกษาอิทธิพลของชนิดแหล่งคาร์บอนในอาหาร Yeast extract-Peptone ต่อ DP และลักษณะทางกายภาพของเส้นใยเซลลูโลสจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ใน *A. xylinum* ATCC10821 พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด รองลงมา คือ กาแลกโตสและไซโลสตามลำดับ แม้จะไม่พบความแตกต่างในด้าน DP ของเซลลูโลสที่ได้จากแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด แต่ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงว่าเส้นใยเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสและไซโลสมีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 12a และ 12b จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลลูโลสที่ได้โดย Gas Chromatography พบว่าเซลลูโลสที่ได้จากการใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนมีองค์ประกอบที่เป็นน้ำตาลชนิดอื่นที่ไม่ใช่กลูโคสอยู่ถึง 20% ในขณะที่เซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงด้วยกลูโคสจะมีองค์ประกอบดังกล่าวเพียง 5.9%

2.7.3 แหล่งไนโตรเจน

แม้ว่าสารอาหารไนโตรเจนจะเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างพอลิแซคคาไรด์หลายๆสายพันธุ์ เช่น *Aerobacter aerogenes, Pseudomonas, Pullularia pullulans* และ *Xanthomonas campetris* จะสร้างพอลิแซคคาไรด์ได้ดีในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนในอาหารที่มากเกินไปจะลดประสิทธิภาพการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรทให้เป็นพอลิแซคคาไรด์ (Whistler and BeMiller, 1973 อ้างถึงใน อังคณา พันธุ์ศรี, 2541)



(a)



(b)

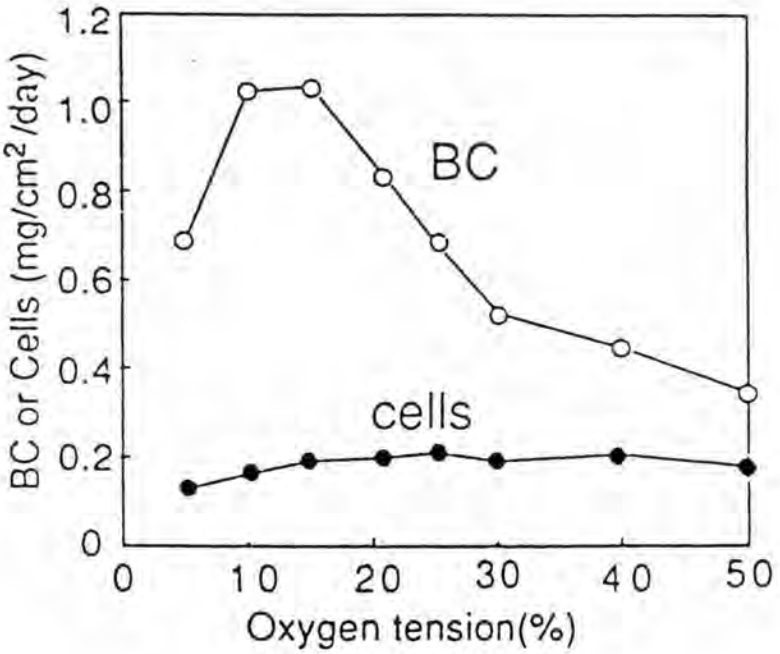
รูปที่ 12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะของเซลลูโลสที่ผลิตจาก *A. xylinum* เมื่อใช้น้ำตาล (a) กลูโคส และ (b) ไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอน

ที่มา: Romano และคณะ (1989)

อย่างไรก็ตาม *A. xylinum* นั้นแตกต่างออกไป กล่าวคือการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ส่งผลให้เกิดการสร้างพอลิแซคคาไรด์อันได้แก่เซลลูโลสมากขึ้นแต่อย่างใด ดังเช่นในงานวิจัยของ Dudman ในปี 1959 ที่ทำการแปรปริมาณไนโตรเจนใน defined medium ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองแสดงว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำที่สุดที่เพียงพอต่อการใช้น้ำตาลกลูโคส การเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *A. acetigenum* EA-I คือ 0.01% สำหรับทั้งแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ (asparagine:glutamic acid = 1:1) และสารอนินทรีย์ (แอมโมเนียมซัลเฟต) การจำกัดปริมาณไนโตรเจนในอาหารให้ต่ำกว่า 0.01% จะส่งผลให้การใช้น้ำตาลกลูโคส การเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อลดลง แม้ว่าการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในช่วง 0.01-0.1% จะไม่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ แต่เมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนจากแหล่งที่เป็นสารอินทรีย์เพิ่มเป็น 0.2% พบว่าเชื้อมีการเจริญและการสร้างเซลลูโลสสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกรดอะมิโนส่วนเกินสามารถถูก deamination ให้กลายเป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครปและถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ ต่อมาในปี 1994 Embuscado และคณะ ศึกษาผลของปริมาณไนโตรเจนจากยีสต์สกัดและ peptone ต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *A. xylinum* ในอาหาร defined medium ผลที่ได้สอดคล้องกับผลงานของ Dudman (1959) กล่าวคือความเข้มข้นของไนโตรเจนในช่วง 0.02-0.16% ไม่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสในระยะ 8 วันแรกของการเลี้ยง

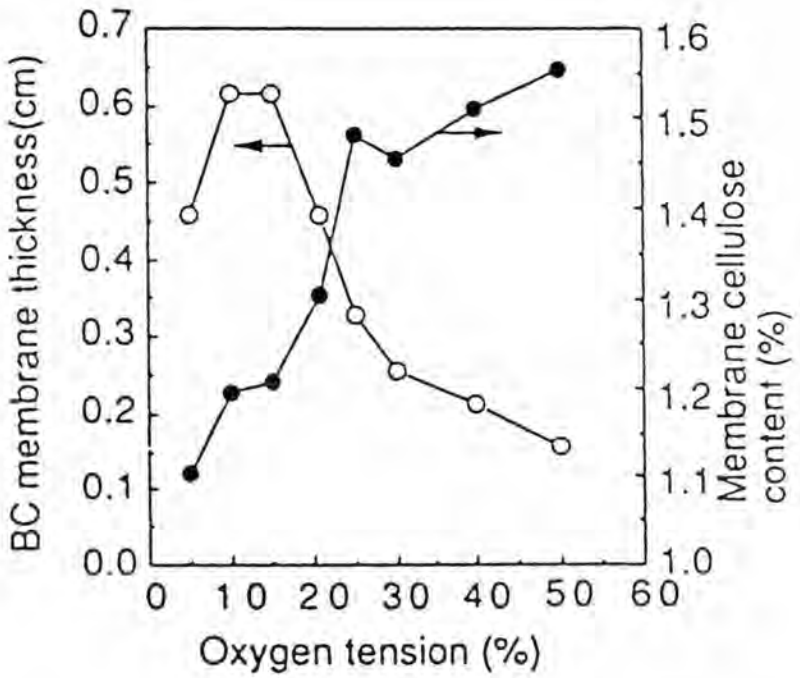
2.7.4 ความเข้มข้นของออกซิเจนใน gaseous phase

ในปี 1995 Watanabe และ Yamanaka ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของความเข้มข้นของออกซิเจนใน gaseous phase ต่อการสร้างเซลลูโลสและลักษณะทางกายภาพของแผ่นวุ้นที่สร้างโดย *A. xylinum* ในสภาพการหมักแบบวางนิ่ง ผลการทดลองที่ได้พบว่าความเข้มข้นของออกซิเจนใน gaseous phase ที่ทำให้เชื้อผลิตเซลลูโลสได้มากที่สุด คือ 10-15% และปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จะลดลงเรื่อยๆเมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนสูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 13 อย่างไรก็ตามพบว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของออกซิเจนใน gaseous phase มีอิทธิพลน้อยมากต่อจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียในแผ่นวุ้นเมื่อเทียบกับอิทธิพลที่มีต่อปริมาณเซลลูโลสที่ผลิต ในส่วนของสมบัติทางกายภาพของแผ่นวุ้นเซลลูโลสนั้น พบว่าความหนาของแผ่นวุ้นที่ได้จะสูงที่สุดเมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนอยู่ในช่วง 10-15% แต่เมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนสูงขึ้นแผ่นวุ้นที่ได้จะมีความหนาลดลง ในขณะเดียวกันปริมาณเซลลูโลสในแผ่นวุ้น (%Cellulose content) จะมีค่าสูงขึ้นดังแสดงในรูปที่ 14 เมื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของเส้นใยเซลลูโลสและการสานกันของร่างแหด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบส่องกราด แม้ว่าเส้นใยเซลลูโลสที่ความเข้มข้นของออกซิเจนต่างๆจะไม่มีความแตกต่างในด้านความกว้างของเส้นใยแต่เมื่อพิจารณาในแง่ของความหนาแน่นของเส้นใยที่สานกันเป็นร่างแหนั้นพบว่า เมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนสูงขึ้นร่างแหเซลลูโลสจะมีความหนาแน่นของเส้นใยเซลลูโลสสูงขึ้น ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 15 a – 15 c ทั้งนี้ผู้วิจัยเสนอว่าเมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนใน gaseous phase สูงขึ้นนั้นเชื้อจะสร้างเส้นใยเซลลูโลสที่มี



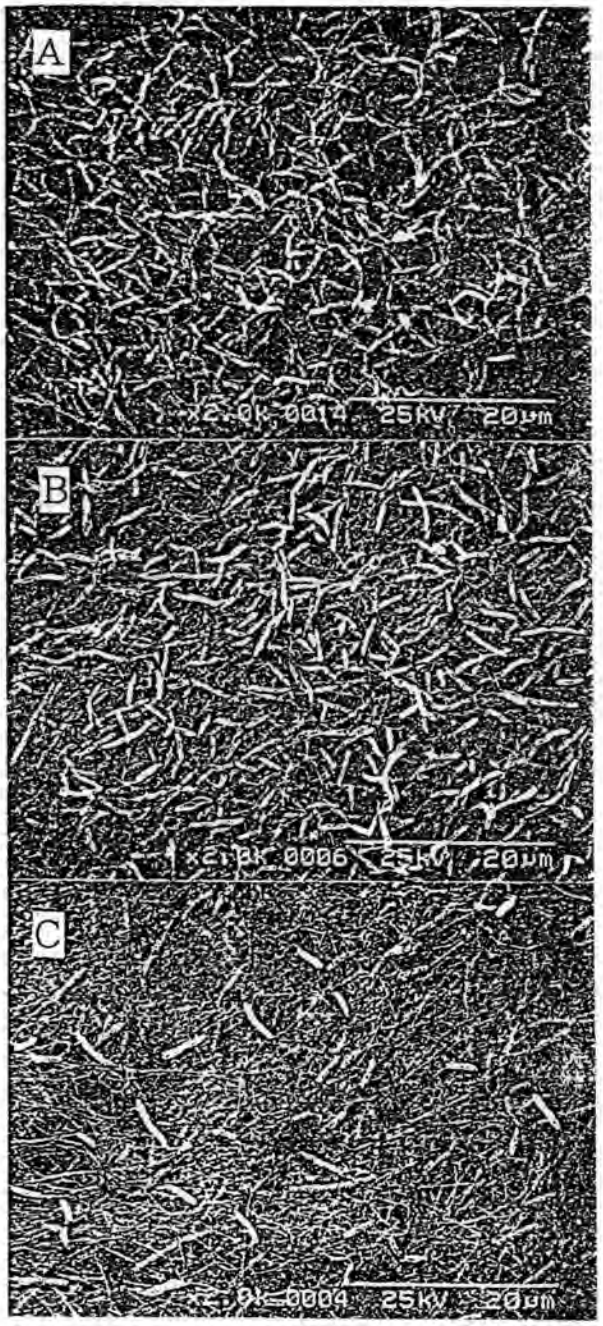
รูปที่ 13 กราฟแสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของออกซิเจนใน gaseous phase ต่อปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้

ที่มา: Watanabe และ Yamanaka (1995)



รูปที่ 14 กราฟแสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของออกซิเจนใน gaseous phase ต่อความหนาและปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียกของแผ่นวุ้นเซลลูโลส

ที่มา: Watanabe และ Yamanaka (1995)



รูปที่ 15 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะของร่างแหเซลลูโลสที่ความเข้มข้นของออกซิเจนใน gaseous phase ต่างๆ

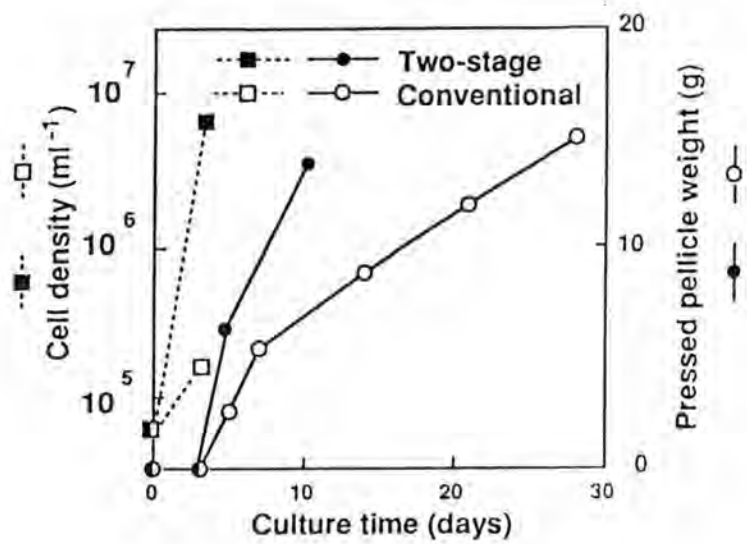
(a) 10% (b) 21% และ (c) 50%

ที่มา: Watanabe and Yamanaka (1995)

ความยาวของเซลลูโลสไฟบริลที่อยู่ระหว่างจุดที่เกิดการแตกกิ่ง หรือ segment สั้นลง ทำให้ร่างแห เซลลูโลสที่เกิดจากการสานกันของเส้นใยดังกล่าวแน่นขึ้นและสามารถอุ้มน้ำไว้ในร่างแหได้ลดลง ส่งผล ให้แผ่นวุ้นเซลลูโลสที่ได้มีเนื้อสัมผัสที่แข็งมากขึ้น อย่างไรก็ตามผู้วิจัยไม่ได้เสนอค่าแสดงเนื้อสัมผัสของ แผ่นวุ้นที่ได้แต่อย่างใด

2.7.5 การเขย่า

Okiyama, Shirae และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของการเร่งการเจริญของเชื้อสาย พันธุ์ AJ12368 โดยการเลี้ยงแบบเขย่าในอาหารสูตร YE ซึ่งเติมน้ำตาลซูโครส 5% เป็นเวลา 3 วันก่อนทำ การเลี้ยงแบบวางนิ่ง ต่อการเจริญและลักษณะของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่เชื้อสร้างได้ ผลการทดลองดังแสดง ในรูปที่ 16 และตารางที่ 3 พบว่าปริมาณเชื้อตั้งต้นที่สูงกว่าของการเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนส่งผลให้การสร้าง แผ่นวุ้นเกิดเร็วขึ้น และแผ่นวุ้นที่ได้มีปริมาณเซลลูโลสสูงขึ้นมาก



รูปที่ 16 อิทธิพลของการเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนต่อการเจริญและปริมาณเซลลูโลสของแผ่นวุ้น
ที่มา: Okiyama, Shirae และคณะ (1992)

ตารางที่ 3 อิทธิพลของการเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนต่อสมบัติของแผ่นวุ้นเซลลูโลส

วิธีเลี้ยง	ความหนา (มม)	%Cellulose content
การเลี้ยงแบบวางนิ่ง	16.0 ± 3.2	0.5 ± 0.1
การเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน	13.7 ± 1.1	0.9 ± 0.0

ที่มา: Okiyama, Shirae และคณะ (1992)

2.8 การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหาร

วิธีการวัดเนื้อสัมผัสอาหารด้วยเครื่องมือแบ่งออกเป็น 3 ประเภท (Szczesniak, 1963)

2.8.1 การทดสอบพื้นฐาน (Fundamental test) ซึ่งเป็นการวัดคุณสมบัติต่างๆที่วิศวกรใช้ในการบอกลักษณะทางกายภาพของวัสดุ เช่น ค่า Modulus แบบต่างๆ อย่างไรก็ตามการทดสอบแบบนี้ไม่สอดคล้องนักกับการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบ

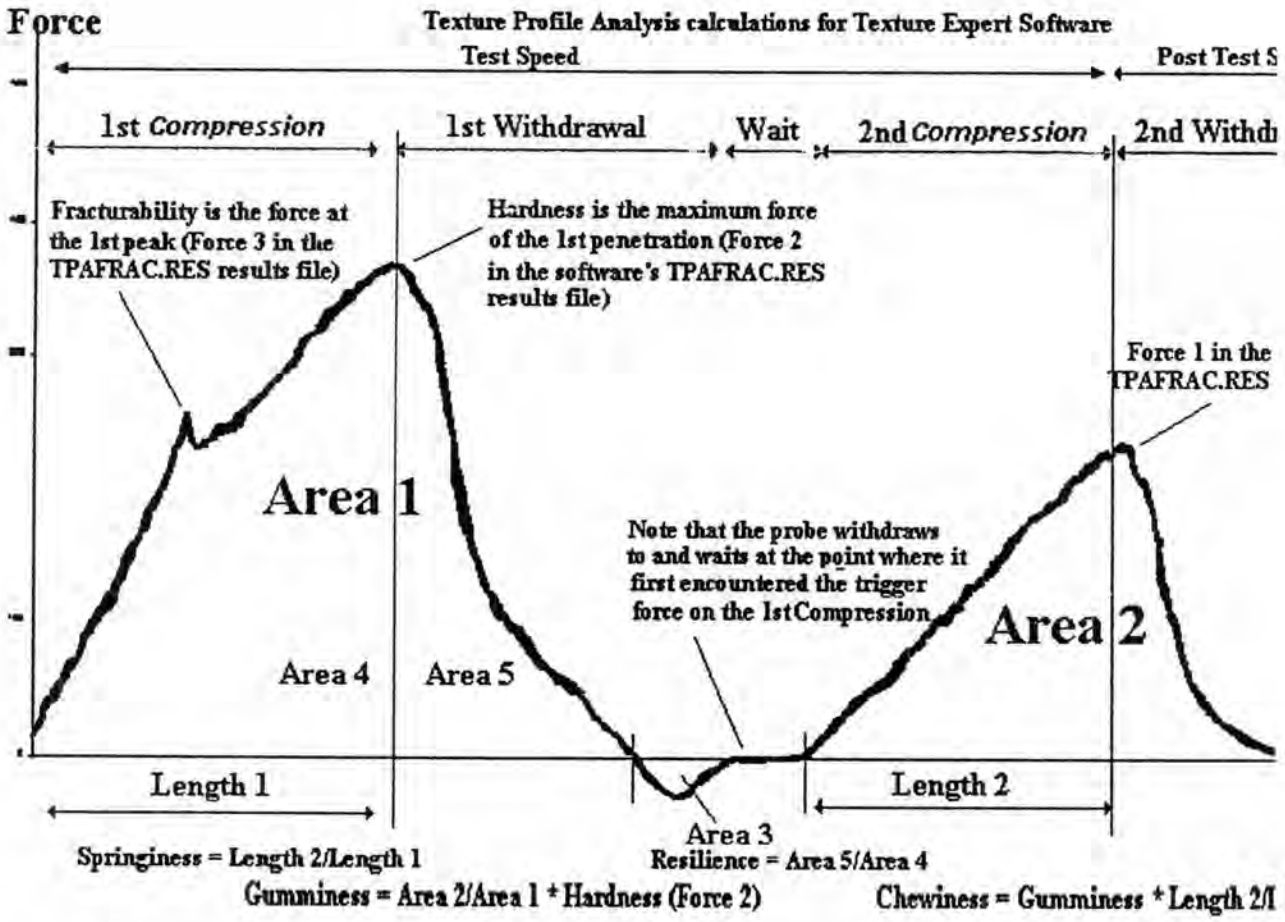
2.8.2 การทดสอบแบบทดลอง (Empirical test) ครอบคลุมการทดสอบหลายชนิด เช่น Puncture test, Shear test และการทำ Extrusion วิธีการเหล่านี้มีความสัมพันธ์ดีกับคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสของอาหารและสอดคล้องกับการทดสอบทางประสาทสัมผัสได้เป็นอย่างดี

2.8.3 การทดสอบเลียนแบบ (Imitative test) เป็นการวัดค่าความรู้สึกสัมผัสด้วยเครื่องมือ โดยการพยายามออกแบบเครื่องมือเพื่อวัดค่าทางกายภาพที่แสดงถึงความรู้สึกสัมผัสของมนุษย์ ทั้งความรู้สึกสัมผัสที่เกิดจากมือ (finger feel) และความรู้สึกที่เกิดจากปาก (mouth feel) เช่น การเคี้ยว การทดสอบด้วย Texture Profile Analysis ก็ถูกพัฒนามาจากแนวทางนี้

2.9 Texture Profile Analysis (TPA)

เครื่อง General Food Texturometer เป็นเครื่องมือวัดลักษณะเนื้อสัมผัสที่ให้ข้อมูลในรูปกราฟระหว่างแรงกับเวลาหรือระยะทาง (texture profile) โดยเทคนิค TPA เป็นการทดสอบเลียนแบบการเคี้ยวของมนุษย์ โดยการบดอัดชิ้นอาหารขนาดมาตรฐานสองครั้งและจะให้ข้อมูลในรูปของ TPA curve ซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 17 การวิเคราะห์กราฟแรงและเวลาทำให้ได้ตัวแปรทางเนื้อสัมผัสอาหารมา 7 อย่าง เป็นตัวแปรจากการวัด 5 อย่างและตัวแปรที่คำนวณจากตัวแปรที่วัดอีก 2 อย่าง ดังต่อไปนี้

1. Fracturability (Brittleness หรือความเปราะ) คือแรงที่ทำให้ปรากฏรอยแยกแรกในเส้นกราฟ
2. Hardness (ความแข็ง) คือ force peak ของการกดครั้งแรก
3. Cohesiveness (ความเหนียว) คือ อัตราส่วนของพื้นที่ที่แรงเป็นบวกระหว่างรอบการกดที่ 2 กับรอบที่ 1 เป็นค่าที่แสดงถึงความแข็งแรงของพันธะภายในที่ก่อให้เกิดรูปร่างของผลิตภัณฑ์
4. Adhesiveness (ความยึดเกาะ) คือ พื้นที่ที่แรงเป็นลบสำหรับการกดครั้งแรก ใช้แทนงานที่จำเป็นในการดึงหัววัดออกจากตัวอย่างซึ่งเทียบได้กับงานที่ใช้ในการลดแรงดึงดูดระหว่างผิวของอาหารกับผิวของวัตถุอื่นที่อาหารไปสัมผัสด้วย เช่น ลิ้น ฟัน เพดานปาก
5. Springiness (Elasticity หรือความยืดหยุ่น) คือความสูงที่อาหารคืนตัวขณะเริ่มต้นการกดครั้งที่ 2 ต่อความสูงของอาหารขณะสิ้นสุดการกดครั้งแรก



รูปที่ 17 TPA curve จากการทำ TPA test

ที่มา: Charpa Techcenter

6. Gumminess คือผลคูณของค่า Hardness กับ Cohesiveness
7. Chewiness (ความบดเคี้ยว) คือผลคูณของ Gumminess กับ Springiness (เท่ากับ Hardness x Cohesiveness x Springiness) แสดงพลังงานที่ต้องการในการบดเคี้ยวผลิตภัณฑ์อาหารแข็ง

จากการทดลองของ Szczesniak, Brandt และ Friedman (1963) พบว่าตัวแปรเหล่านี้มีความสัมพันธ์ยอดเยี่ยมกับการทดสอบทางประสาทสัมผัส

2.10 การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้นเซลลูโลส

แม้ว่างานวิจัยที่ทำการวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่สร้างจาก *A. xylinum* โดยใช้เครื่องมือวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารยังมีไม่มากนัก ซึ่งอาจเนื่องมาจากแผ่นวุ้นเซลลูโลสซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำนั้นสูญเสียน้ำได้ง่าย ทำให้การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสโดยวิธีเชิงกลทำได้ยากและค่าที่ได้ไม่แน่นอน แต่เนื่องจากลักษณะเนื้อสัมผัสจัดเป็น critical factor ซึ่งมีความสำคัญในการกำหนดคุณภาพของผลิตภัณฑ์วุ้นน้ำมะพร้าวหรือแผ่นวุ้นเซลลูโลส ดังนั้นจึงมีความพยายามในการพัฒนาวิธีการวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้นและศึกษาถึงอิทธิพลของการแปรรูปต่อลักษณะเนื้อสัมผัส ดังนี้

ในปี 1986 Camodag และ Uyenco (cited in Okiyama, Motoki, and Yamanaka, 1992) ทดลองวัดความแข็งของแผ่นวุ้นเซลลูโลสโดยใช้ Humboldt Universal penetrometer แต่ผลที่ได้ไม่แน่นอน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความไม่เหมาะสมของเครื่องมือและวิธีการวัดที่ใช้ ต่อมา Okiyama, Motoki และ Yamanaka (1992) ทำการวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้นด้วยเครื่อง Rheometer โดยใช้หัวเจาะแบบลูกตุ้มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตรเพื่อเปรียบเทียบลักษณะเนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้นสดที่ยังไม่ผ่านการแปรรูปกับเจลของ agar และเจลาติน และทำการศึกษาอิทธิพลของการแปรรูปแผ่นวุ้นโดยการแช่แผ่นวุ้นในสารละลายของน้ำตาลแอลกอฮอล์ ซึ่งประกอบด้วย solbitol (0-5%), maltitol (45-55%), moltitriol (15-25%) และ oligosugar alcohol (20-30%) โดยมีค่า DE เท่ากับ 40 และโซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate + calcium chloride) ต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้นด้วยเครื่อง Texturometer โดยใช้หัวเจาะแบบตัดตรงที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ผลการทดลองพบว่าแผ่นวุ้นสดมีความแข็งและเหนียวมาก โดยค่าความแข็งที่ได้จากการเจาะมีค่าสูงกว่าเจลของ agar (3%) และเจลาติน (5%) มากกว่า 6 และ 16 เท่าตามลำดับ นอกจากนี้ texture curve ของการเจาะซึ่งไม่ปรากฏการแตกของ force peak ยังแสดงว่าขณะทำการวัดนั้นหัววัดไม่ได้เจาะทะลุผ่านเข้าไปในแผ่นวุ้น แต่เป็นการกดลงไปเท่านั้น ซึ่งแตกต่างจากเจลของ agar ซึ่งเปราะแตกง่าย (fragile) และเจลของเจลาตินซึ่งมีความยืดหยุ่นสูง (elastic) ทั้งนี้เนื่องมาจากแผ่นวุ้นเซลลูโลสมีการกักเก็บน้ำไว้ในโครงสร้างอย่างหลวมๆ จึงสูญเสียน้ำออกมาได้ง่ายเมื่อถูกกด ทำให้ไม่มีลักษณะของ self-supporting gel เหมือนเจลของ agar และเจลาติน การทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนแล้วแสดงว่าแผ่นวุ้นสดที่ยังไม่ผ่านการแปร

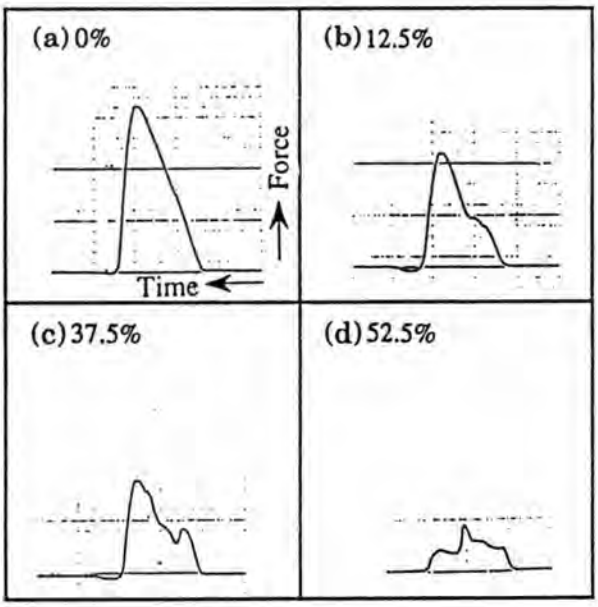
รูปมีความแข็งและเหนียวมาก ในขณะเดียวกันก็มีความเปราะและความยืดหยุ่นต่ำมากและไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

เมื่อทำการแปรรูปแผ่นวุ้นเซลลูโลสโดยการแช่ในสารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์และโซเดียมอัลจิเนต แผ่นวุ้นจะมีค่าความแข็งและค่า %Syneresis ซึ่งแสดงถึงการเสียน้ำออกจากโครงสร้างต่ำลง นอกจากนี้ texture curve ของการเจาะยังปรากฏการแตกของ force peak ดังรูปที่ 18 แสดงว่าหัววัดสามารถเจาะทะลุเข้าไปในเนื้อวุ้นได้ โดยเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลแอลกอฮอล์และโซเดียมอัลจิเนตสูงขึ้นนั้น นอกจากค่าแรงเจาะซึ่งแสดงถึงความแข็งของแผ่นวุ้นจะลดลงแล้ว ค่าที่วัดได้จะมีความแปรปรวน (standard deviation) ต่ำลงด้วย ซึ่งแสดงว่าเนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้นที่ได้มีความสม่ำเสมอมากขึ้น เนื่องจากการแปรรูปด้วยน้ำตาลแอลกอฮอล์และโซเดียมอัลจิเนตให้ผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสเหมือนกันและสอดคล้องกับผลที่ได้จากการแปรรูปแผ่นวุ้นสดด้วยสารละลายน้ำตาลเข้มข้น (Marrs, 1982 cited in Okiyama, Motoki and Yamanaka, 1992) ดังนั้นปัจจัยที่ทำให้แผ่นวุ้นมีความแข็งลดลงและเสียน้ำออกมาได้น้อยลงจึงน่าจะเป็นความหนืดของสารละลายที่ใช้มากกว่าจะเป็นอิทธิพลของน้ำตาลแอลกอฮอล์

ทั้งนี้เนื่องจากการแช่แผ่นวุ้นในสารละลายของพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้และมีความหนืดสูงจะทำให้โครงสร้างของแผ่นวุ้นประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิด ซึ่งจัดเป็น binary polymer gel network ชนิด phase-separated network ซึ่งมีลักษณะเป็นร่างแหของพอลิเมอร์ที่มีร่างแหของพอลิเมอร์อีกชนิดที่ละลายน้ำได้แทรกอยู่ภายใน ดังแสดงในรูปที่ 19c โดยพอลิเมอร์ชนิดที่ 2 จะทำหน้าที่เป็น swelling gels หรือ combating syneresis ซึ่งจะช่วยกักเก็บน้ำไว้ในโครงสร้างของร่างแหเซลลูโลสและลดการเกิด syneresis ของแผ่นวุ้น ทำให้แผ่นวุ้นเกิดลักษณะของ self-supporting gel เช่นเดียวกับเจลของ agar และเจลาติน เมื่อทำการเจาะหัววัดจึงสามารถเจาะทะลุลงไปในเนื้อวุ้นได้และทำให้ความแข็งของแผ่นวุ้นที่วัดได้ลดลง นอกจากนี้พอลิเมอร์ชนิดที่ 2 จะขัดขวางการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายของเซลลูโลส ทำให้ร่างแหเซลลูโลสหลวมมากขึ้น (swelled and loose) และเส้นใยเซลลูโลสบางส่วนเกิดการกระจายออก (disintegrate) ทำให้แผ่นวุ้นมีความแข็งลดลงและใสขึ้น (translucent) เมื่อทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการทำ TPA ผลที่ได้คือแผ่นวุ้นที่ผ่านการแช่สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์และโซเดียมอัลจิเนตมีความแข็งและความเหนียว (cohesiveness) ลดลง แต่จะมีค่าความเปราะ (fracturability) และความยืดหยุ่น (springiness) สูงขึ้น เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคโดยแผ่นวุ้นที่ผ่านการแช่สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์มีเนื้อสัมผัสคล้ายเนื้อองุ่น ในขณะที่แผ่นวุ้นที่แช่ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตจะมีความแข็งมากกว่าและมีเนื้อสัมผัสคล้ายเนื้อปลาหมึก ทั้งนี้อาจเนื่องมากจากเจลที่เกิดจากโซเดียมอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์มีความแข็งสูง

ต่อมาในปี 2541 อภิสิทธิ์ ศรีอรุณเรืองชัยนำวิธีวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของ Okiyama, Motoki และ Yamanaka (1992) มาใช้ในการประเมินคุณภาพของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่สร้างจากเชื้อ *A. xylinum* จำนวน 6 สายพันธุ์ที่แยกได้จากธรรมชาติ

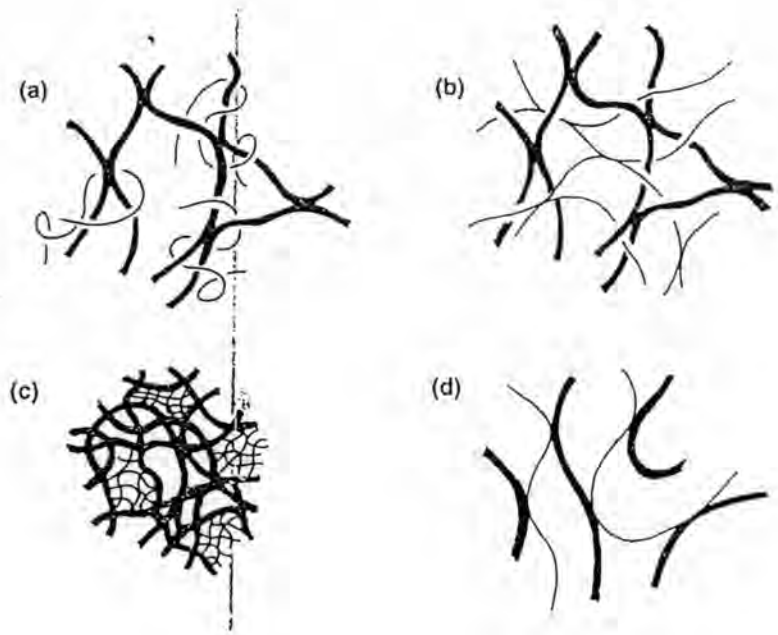
Chung และ Shyu (1999) ศึกษาอิทธิพลของการแช่แผ่นวุ้นเซลลูโลสในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ (0, 1, 3 และ 5%w/w) และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 2, 5 และ



รูปที่ 18 Texture curve ของการเจาะแผ่นวุ้นสดที่ผ่านการแช่ในสารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างๆ

(a) 0% (b) 12.5% (c) 37.5% และ (d) 52.5%

ที่มา: Okiyama, Motoki และ Yamanaka (1992)



รูปที่ 19 ภาพจำลองแสดงลักษณะของ binary polymer gel network แบบต่างๆ

(a) network formed by one polysaccharide alone

(b) interpenetrating network formed by independent gelation of each polysaccharide

(c) phase-separated network formed by demixing and subsequent gelation of the two polysaccharides

(d) coupled network formed by intermolecular binding between the two polysaccharides

ที่มา: Morris (1991)

10 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมงต่อลักษณะเนื้อสัมผัส %moisture content และ %water-holding capacity ซึ่งแสดงถึงปริมาณ bound water ของแผ่นวุ้น รวมถึงศึกษาอิทธิพลของการแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสและการต้มที่ 100 องศาเซลเซียสต่อลักษณะเนื้อสัมผัสด้วย งานวิจัยนี้ทำการวัดลักษณะเนื้อสัมผัสโดยเครื่อง Texture Analyzer และใช้หัววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรที่ความเร็ว 2 มม/ วินาทีและระยะกด 50% strain ในการทำ TPA ของแผ่นวุ้น ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น แผ่นวุ้นจะมีค่า %moisture content และ %water-holding capacity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าโซเดียมคลอไรด์นอกจากจะทำให้แผ่นวุ้นมีปริมาณน้ำน้อยลงแล้วยังส่งผลต่อปริมาณ bound water ของแผ่นวุ้นด้วย โดยเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น 5% แผ่นวุ้นจะมีค่า %moisture content ลดลงประมาณ 2% เนื่องจากการแพร่ของน้ำออกจากแผ่นวุ้น ในขณะที่การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างนั้นจะส่งผลต่อค่า %moisture content และ %water-holding capacity น้อยมาก

ในด้านของอิทธิพลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างต่อลักษณะเนื้อสัมผัส พบว่าค่าแสดงเนื้อสัมผัสที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญมีเพียงความแข็งเท่านั้น โดยเมื่อสารละลายเป็นกลางนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จะทำให้แผ่นวุ้นมีความแข็งมากขึ้น ซึ่งน่าจะเกิดเนื่องมาจากการที่แผ่นวุ้นมีค่า %moisture content ลดลงแต่ลักษณะดังกล่าวจะไม่เกิดขึ้นเมื่อสารละลายเป็นกรดหรือด่าง ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับหรือมากกว่า 1% นั้นการปรับสารละลายให้เป็นกรดหรือด่างจะช่วยให้แผ่นวุ้นที่ได้มีความแข็งน้อยกว่าเมื่อสารละลายเป็นกลาง ดังนั้นการแปรรูปแผ่นวุ้นสดโดยการแช่ในน้ำเกลือนั้นควรจะทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายให้อยู่ในช่วงกรดหรือด่างเพื่อไม่ให้แผ่นวุ้นที่ได้มีความแข็งสูงขึ้น นอกจากนี้เนื่องจากการต้มที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงและการแช่แข็งที่อุณหภูมิ –25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงไม่ทำให้ %moisture content ของแผ่นวุ้นเปลี่ยนแปลงแต่ทำให้ค่า %water-holding capacity ลดลง ซึ่งอาจเนื่องมากจากการต้มและการแช่แข็งอาจทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสและน้ำทำให้ bound water บางส่วนเปลี่ยนเป็น free water ผลจากการวัดลักษณะเนื้อสัมผัสแสดงว่าการต้มไม่ทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้นเปลี่ยนแปลงไป ในขณะที่การแช่แข็งจะทำให้แผ่นวุ้นมีความแข็งลดลงแต่มีความเหนียว ความยืดหยุ่น ความหนืบและความบดเคี้ยวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

ต่อมาในปี 2000 Sheu และ Tai ทำการศึกษาผลของการแช่แผ่นวุ้นเซลลูโลสในสารละลายน้ำตาล (10-60%) โซเดียมคลอไรด์ (2-10%) และกัมชนิดต่างๆ ได้แก่ เพคติน คาราจีแนน และอัลจิเนต (0.5-2%) รวมทั้งผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้นโดยการวัดด้วยเครื่อง Texture Analyzer และใช้หัววัดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรที่ความเร็วในการกด 5 มม/ วินาที และกดเป็นระยะ 90% strain ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลงานของ Okiyama, Motoki และ Yamanaka (1992) กล่าวคือการแช่แผ่นวุ้นสดในสารละลายน้ำตาลและกัมชนิดต่างๆจะส่งผลให้แผ่นวุ้นมีความแข็งน้อยลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้น ในขณะที่การแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆและค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมีผลต่อความแข็งของแผ่น

วุ้นเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าแรงเฉือน (shear force) ของแผ่นวุ้นแปรผันตรงต่อปริมาณเซลลูโลสในแผ่นวุ้นและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.83 ในขณะที่ปริมาณน้ำในแผ่นวุ้นจะแปรผกผันต่อปริมาณเซลลูโลสในแผ่นวุ้นและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.99

ต่อมา Yano, Budhiono และ Sugiharto (2000. cited in Iguchi, Yamanaka, and Budhiono, 2000) ทำการศึกษาลักษณะเนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้นสดโดยการทำ stress relaxation test และได้ mechanical model และ mathematical expression ของแผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวสดเป็นแบบ three-element Maxwell model ดังสมการต่อไปนี้

$$f = 8.5 \exp(-3.64 \times 10^{-3}) + 14.9 \exp(-7.00 \times 10^{-2}) + 45.2 \exp(-5.40 \times 10^{-1})$$

2.11 <u>การใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสที่ผลิตโดย *A. xylinum*</u>

ในปัจจุบันผลผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวส่วนใหญ่ของประเทศจะถูกนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์วุ้นน้ำมะพร้าวเชื่อม โดยแผ่นวุ้นที่มีคุณภาพดีจะต้องมีผิวหน้าเรียบ เนื้อวุ้นเนียน นุ่ม เหนียวพอเหมาะและไม่มีกากหรือเส้นใยเมื่อเคี้ยว (สมคิด ธรรมรัตน์, 2531: 250) อย่างไรก็ตามเนื่องจากแผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวมีคุณสมบัติที่โดดเด่นในด้านความสามารถในการอุ้มน้ำไว้ในโครงสร้างของแผ่นวุ้น ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้แผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวในรูปแบบอื่นๆ เช่น ผลิตเป็นผิวหนังเทียมสำหรับบาดแผลไฟไหม้ เนื่องจากแผ่นวุ้นมีความสามารถในการอุ้มน้ำสูงและยอมให้อากาศผ่านได้ จึงกระตุ้นให้เกิดการสร้างผิวหนังใหม่ได้ดี ในขณะเดียวกันก็ช่วยลดการติดเชื้อของบาดแผล ไม่ระคายเคืองต่อผิวหนังและมีความเหนียวสูงเมื่อเปียก (Fontana et al., 1990; Jonas and Farah, 1998; Joris and Vandamme, 1993. cited in Sutherland, 1998) หรือการใช้เป็นวัสดุสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Watanabe et al., 1993) นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้เป็นวัสดุสำหรับการตรึงเซลล์แบคทีเรีย (Fiedler, S., Schnurra, I., and Sattler, K., 1990. cited in Vandamme et al., 1998) และเอนไซม์ (D'-Angiuro, L., Seves, A., and Romano, M., 1991 cited in Jonas and Farah, 1998; Solas et al., 1994)

เนื่องจากเซลลูโลสที่ได้จากวุ้นน้ำมะพร้าวมีคุณสมบัติหลายประการที่ดีกว่าเซลลูโลสจากพืชและเส้นใยอื่นๆ คือ เซลลูโลสที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงเนื่องจากไม่มีลิกนิน เฮมิเซลลูโลและเพคติน (White and Brown, 1989) มีความเป็นผลึก (crystallinity) สูงทำให้เมื่อนำไปขึ้นรูปจะได้แผ่นชีทที่มีความทนต่อแรงดึง (Young's modulus) สูงกว่าแผ่นชีทจากเส้นใยธรรมชาติและเส้นใยสังเคราะห์อื่นๆ (Nishi et al., 1990) นอกจากนี้เส้นใยเซลลูโลสที่มีขนาดเล็กมากยังส่งผลให้เซลลูโลสที่ได้มีความสามารถในการอุ้มน้ำและดูดซับสารเคมีได้ดี (Thompson et al., 1988. cited in White and Brown, 1989: 577) ดังนั้นจึงมีการนำเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กระดาษลำโพง (acoustic transducer diaphragm) ทั้งนี้เนื่องจากแผ่นชีทที่ได้มีค่า Young's modulus สูงแต่มีความหนาแน่นต่ำจึงให้คลื่นเสียงความเร็วสูง (high sonic velocity) และมีสมบัติการลดเสียงรบกวน (internal loss) สูง

กว่าวัสดุที่มีค่า sonic velocity สูงทั่วๆไป ทำให้ได้คุณภาพเสียงที่ชัดเจน (Nishi et al., 1990) นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในผลิตกระดาษและฟิลม์ที่มีคุณสมบัติพิเศษ โดยการนำไปผสมกับเส้นใยที่ใช้ทำกระดาษและฟิลม์ทั่วไป เช่น เซลลูโลสจากพืช หรือพอลิเมอร์สังเคราะห์เพื่อผลิตเป็นกระดาษหรือฟิลม์ที่มีความทนแรงดึง (tensile strength) สูงและกักเก็บสารเติมแต่ง (filler) ต่างๆเช่น แคลเซียมคาร์บอเนตได้ดี (รังสิมา ชลคุป, 2538; Kitamura and Katasura, 1989. cited in รังสิมา ชลคุป, 2538) นอกจากนี้ยังใช้เป็นตัวเชื่อม (binder) โดยการผสมกับเส้นใยชนิดอื่น ซึ่งปกติไม่สามารถทำให้เป็นแผ่นได้ เช่น ใยแก้ว ฟีนอลเรซินหรือเส้นใยคาร์บอน เช่น การผลิตกระดาษคาร์บอน (activated carbon fiber sheets) เพื่อใช้ในการดูดซับสารพิษ การใช้ประโยชน์ในรูปแบบอื่นๆ เช่น การใช้เป็นสารให้ความหนืด (thickener) สารให้ความคงตัว (stabilizer) และสารทดแทนไขมัน (fat-substitute) ในผลิตภัณฑ์อาหาร (Okiyama, Motoki and Yamanaka, 1993; Ougiya et al., 1997) ยา เครื่องสำอาง เซรามิกส์ สีและน้ำหมึก (Biopolymer Research, 1996. cited in Jonas and Farah, 1998: 105) นอกจากนี้ยังนำไปผลิตเป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น hydroxymethyl cellulose, carboxymethyl cellulose หรือ cellulose acetate ซึ่งจะทำให้สามารถใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางขึ้น (Geyer et al., 1994; Tabuchi et al., 1998) การใช้เป็นเยื่อเลือกผ่าน (filter membrane) สำหรับไมโครฟิลเทรชั่น (microfiltration) อัลทราฟิลเทรชั่น (ultrafiltration) (Fraunhofer, 1991. cited in Jonas and Farah, 1998: 105; Shibazaki et al., 1993) และเยื่อเลือกผ่านสำหรับ osmometer (Masson et al., 1946. cited in White and Brown, 1989)