# บทที่ 5

## วิจารณ์ผลการทดลอง

จากความแตกต่างของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ เจริญได้ดีในภาวะที่ต่างกัน ดังนั้นจึงเริ่มต้นด้วยการศึกษา ค่าความเป็นกรด, ปริมาณน้ำตาล ที่เหมาะสมต่อปริมาณเซลลูโลส เนื่องจากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความสัมพันธ์ต่อการเจริญ และการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ โดยเป็นแหล่งพลังงานแก่เชื้อ และองค์ประกอบหลักของสายเซลลูโลส ในการทดลองนี้ใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ปริมาณน้ำตาลในน้ำมะพร้าวมีไม่แน่นอนขึ้นกับสายพันธุ์ ความอ่อนแก่ ของมะพร้าว โดยน้ำมะพร้าวแก่มีเพียง 2 กรัม/100 มิลลิลิตร ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส (Grimwood, 1975) ดังนั้นจึงเติมน้ำตาลเพิ่มอีก จากการทดลองนี้ได้ศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสม พบว่าปริมาณน้ำตาล 5.1 %(w/v) เป็นปริมาณที่เชื้อสร้างเซลลูโลสสูงสุด แต่หากใส่มากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อและไม่มีประสิทธิภาพในการผลิตให้สูงขึ้น อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้สูงขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Alaban (1962) ได้ทดลองหาปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมในน้ำมะพร้าว โดยทดลองให้ความเข้มข้นของน้ำตาลร้อยละ 0 –10 ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมที่ร้อยละ 5 – 8 จะให้แผ่นวุ้นที่มีความหนาสูงสุด นอกจากนั้นถ้าใช้น้ำตาลซูโครสน้อยกว่าร้อยละ 5 วุ้นจะมีเนื้อสัมผัสนิ่ม ส่วนถ้าใช้น้ำตาลซูโครสมากกว่าร้อยละ 8 ความหนาเริ่มลดลง แต่ นัยทัศน์ ภู่ศรันย์ (2527) ใช้เชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* G3 ที่แยกจากฝรั่ง ได้ศึกษาการเติมน้ำตาล 0-15% ในอาหารน้ำมะพร้าว พบว่าความหนาของแผ่นวุ้นไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นในการเลี้ยงเชื้อนี้จึงไม่จำเป็นต้องเติมน้ำตาลก็ได้ ซึ่งแตกต่างจากการทดลองที่ได้เนื่องจากเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลต่างกัน

การปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นให้เหมาะสมจะส่งผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรโตพลาสมของเชื้อจนกระทั่งแบ่งตัวออกเป็นเซลล์ใหม่ (Dimaguila, 1967) ซึ่งจากการทดลองค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม คือ 4.75 แต่ถ้าความเป็นกรด-ด่างน้อยหรือมากกว่าจุดที่เหมาะสมจะให้เซลลูโลสน้อยลง เนื่องจากค่าความเป็นกรดที่สูงอาจจะไปรบกวนความสามารถในการดูดซึมสาร ความสามารถในการละลายของไอออน และความสามารถในการส่งผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ สอดคล้องกับการทดลองของสมศรี ลีปิพัฒนวิทย์ (2531) ศึกษาค่าความเป็นกรดระหว่าง 3-5 โดยการเติมกรดอะซิติก ในอาหารน้ำมะพร้าว พบว่าที่ค่าความเป็นกรด 4.5 จะให้แผ่นวุ้นมีความหนาสูงสุด 1.2 เซนติเมตร และ Satoshi และคณะ (1993)

ทดลองปรับความเป็นกรดเริ่มต้นระหว่าง 2.5-7.5 พบว่า ความเป็นกรดที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4-6 จะได้เซลลูโลสสูงสุด

เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวส่วนใหญ่คือ น้ำตาลทราย จากการทดลอง พบว่าสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายได้ 0.48 บาท/ลิตร แต่ยังให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด 5.46 กรัม/ลิตร เมื่อพิจารณาร่วมกับความหนาของแผ่นวุ้นที่นำไปทำเป็นของหวานต้องการแผ่นวุ้นที่มีความหนา 1.5 เซนติเมตร ขึ้นไป เพราะเมื่อนำไปตัดเป็นชิ้นขนาดเล็กจะได้ลักษณะที่สวยงามน่ารับประทาน (น้ำทิพย์ ด้วงทวี, สัมภาษณ์, มกราคม 2541)ประกอบกับอัตราเร็วการสร้างแผ่นวุ้น (เซนติเมตร/วัน) จะสูงสุดในวันที่ 4 แล้วหลังจากนี้จะลดลง เนื่องจากแผ่นวุ้นที่หนาขึ้นทำให้การแพร่ผ่านของอาหารเหลวด้านล่างไปสู่เซลล์บริเวณแผ่นวุ้นด้านบนเป็นไปได้ยากขึ้น (Borzani and Souza, 1995) จากการทดลองพบว่า ความสูงของน้ำหมักที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงในระยะ 8 วัน คือ 2.5 เซนติเมตร เนื่องจากน้ำหมักหมดพอดี และได้แผ่นวุ้นที่มีความหนาเฉลี่ย 1.6 เซนติเมตร ซึ่งการเตรียมอาหารหมักให้พอดีกับความหนาที่ต้องการสามารถลดปริมาณอาหารหมักที่เหลือทิ้งได้

จากการทดลองศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Acetobacter* sp. TISTR 975 ในอาหารน้ำมะพร้าวที่แปรความเข้มข้นของน้ำตาล และค่าความเป็นกรด-ด่าง จะได้สมการทางคณิตศาสตร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลลูโลส , ความเข้มข้นของน้ำตาล , ค่าความเป็น-ด่าง และอิทธิพลร่วม โดยสามารถทำนายผลผลิตเซลลูโลสได้ เช่น ถ้าต้องการทราบผลการหมักที่ ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.5 ($X_1$) น้ำตาลทราย 4 %w/v ($X_2$) โดยนำ $X_1$ และ $X_2$ ไปแทนค่าในสมการ 1 จะได้ผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 5.149 กรัม/ลิตร เป็นต้น สำหรับกรณีที่เป็นไปไม่ได้เมื่อแทนค่าแทนค่า $X_1$ และ $X_2$ ในสมการผลออกมาค่า Y เป็นค่าติดลบ

จากการสร้างแผ่นวุ้นปิดที่ผิวหน้าอาหารหมักซึ่งเป็นส่วนที่ปิดกั้นออกซิเจนจากอากาศที่ละลายลงสู่อาหารหมัก ดังนั้นจึงได้ศึกษาถึงผลของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก เนื่องจากเชื้อ *Acetobacter* sp. เป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ โดยการแปรความสูงของน้ำหมัก ปริมาตรของน้ำหมัก และพื้นที่ผิวหน้าภาชนะบรรจุ จะเห็นว่าในทุกการทดลองการละลายของออกซิเจนจะลดลงอย่างรวดเร็วจากเริ่มต้นจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 6 ออกซิเจนที่ละลายลดลงจนเกือบถึงศูนย์ และคงที่ต่อไปจนถึงวันที่ 8 ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์มีอายุน้อยและกำลังแบ่งตัวจะใช้ออกซิเจนได้ดีประกอบกับการสังเกตเห็นแผ่นวุ้นใสปิดที่ผิวหน้าอาหารหมักทั้งหมดทำให้ออกซิเจนจากอากาศไม่สามารถถ่ายเทลงสู่อาหารหมักได้ อย่างไรก็ตามเชื้อสามารถสร้างเซลลูโลสต่อได้ เนื่องจากการที่เชื้อต้องการออกซิเจนในการเจริญนี้เองเชื้อจึงลอยตัวอยู่บนผิวหน้าของอาหารที่นิ่ง และเมื่อเชื้อมีจำนวนและความหนาแน่นของปริมาณเชื้อในระดับหนึ่งแล้ว ก็จะเริ่มสร้างวุ้นขึ้น โดยแผ่นวุ้นจะเกิดขึ้นเฉพาะที่ผิวหน้าอาหารหมักเท่านั้น Satoshi และคณะ (1993) ได้ศึกษา

ถึงผลของปริมาตรอาหารหมัก, พื้นที่ผิวหน้าภาชนะ และความลึกอาหารหมักต่อการสร้างเซลลูโลส ของ *A. xylinum* IFO13693 พบว่า ปริมาตรอาหารหมัก และความลึกของอาหารหมักเมื่อให้พื้นที่ผิวหน้าภาชนะคงที่ที่ 100 ตารางเซนติเมตร ไม่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสโดยมีปริมาณเซลลูโลส 0.01 กรัม/ตารางเซนติเมตร นาน 4 วัน ส่วน Yoshino, Asakura, และ Toda (1996) พยายามเพิ่มเซลลูโลสในภาวะนิ่งโดยการเลี้ยง *A. pasteurianus* AP-1SK ในอาหารสังเคราะห์โดยใส่อาหารเหลวในภาชนะที่ก้นทำด้วยเมมเบรนที่ออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้คือ silicone membrane พบว่าเซลลูโลสจะสร้างที่ผิวหน้าของอาหารเหลว และยังสร้างที่ผิวเมมเบรนอีกด้วย จากนั้นนำแผ่น silicone membrane มาเรียงขนานกันมีรูให้อากาศผ่านระหว่างช่องภายในโครงสี่เหลี่ยมแล้วเป่าอากาศผ่านรูเข้า-ออก พบว่ามีเซลลูโลสเกาะที่ผิวเมมเบรนและให้ผลผลิตเป็น 3000 กรัม/ลิตร/สัปดาห์

จากนั้นเพิ่มออกซิเจนโดยการเขย่าจะช่วยให้มีการแผ่กระจายของออกซิเจนในน้ำหมักได้ดี นำไปใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเมแตบอลิสม เกิดการสร้างพลังงาน และสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ และยังเป็นการให้จุลินทรีย์อยู่ในภาวะแขวนลอย พบว่า ภาวะที่เหมาะสมคือ ความเป็นกรด 4.9 น้ำตาลทราย 4.98% ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบ/นาที และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณออกซิเจนที่ละลายซึ่งปกติการเลี้ยงในระดับขวดเขย่าจะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารน้อยแม้จะเพิ่มอัตราในการกวนขึ้นก็ตาม จากการทดลองความเร็วรอบในการเขย่าที่ 100 รอบ/นาที ให้เซลลูโลสสูงสุด 6.07 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นการเขย่าด้วยแรงที่เหมาะสมทำให้เซลล์เจริญได้ดี เนื่องจาก *Acetobacter* sp. เป็นแบคทีเรียพวกเจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศ (obligate aerobe) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายมีพอเพียงกับที่เชื้อนำไปใช้ Okiyama และคณะ (1992) ได้พยายามเร่งการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter aceti* AJ12368 โดยการหมักแบบ 2 ขั้นตอน โดยขั้นแรกเร่งการเจริญของจุลินทรีย์โดยทำการให้อากาศ และมีการกวนระหว่างการหมัก และพบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ของการเลี้ยง จากปริมาณเซลล์ $10^5$ เป็น $10^7$ และปริมาณเซลล์จะคงที่ ในวันที่ 2 และ 3 หลังจากวันที่ 3 แล้ว ปริมาณเซลล์จะลดลง เมื่อหยุดการให้อากาศ เลี้ยงต่อไปจนถึงวันที่ 10 ได้ปริมาณเซลลูโลสมีน้ำหนัก เท่ากับในการเลี้ยงแบบภาวะนิ่งตั้งแต่เริ่มต้น โดยใช้เวลาในการเลี้ยง 27 วัน จากการทดลองเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 150 รอบ/นาที ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีมากเกินกว่าที่เชื้อจะนำไปใช้ ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่มีมากไปเปลี่ยนเป็นกรดกลูโคนิก ส่งผลให้เซลลูโลสที่สร้างลดลงด้วย ทั้งนี้เนื่องจาก ในน้ำมะพร้าวมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งขณะเขย่าเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักให้มากเกินไป ออกซิเจนเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นตัวรับโปรตอน (proton acceptor) ไปทำหน้าที่ออกซิไดซ์กลูโคสให้เปลี่ยนเป็นกลูโคนิกแทนการนำไปใช้สร้างเซลลูโลส โดยปริมาณ

กรดกลูโคนิกที่เพิ่มขึ้นกับความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารหมัก (Morei et al., 1991) นอกจากนั้นพบว่าการเขย่าทำให้มีเส้นใยกระจาย ไม่รวมตัวกันแน่น (Joris et al., 1991) Joris และคณะ (1991) พยายามเร่งผลผลิตเซลลูโลสโดยเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่า เพื่อเพิ่มออกซิเจนให้แก่น้ำหมัก พบว่าการเขย่าผลผลิตลดลง ร้อยละ 50 ของภาวะนิ่ง จากนั้นได้เติม microparticle หลายชนิดโดยเขาสามารถเพิ่มผลผลิตเซลลูโลสได้ถึง 4 เท่า เนื่องจากพบการสร้างเซลลูโลสที่ผิวของ particle ทำให้มีเซลล์บางส่วนถูกตรึงอยู่ด้วยซึ่งเป็นบริเวณที่มีระดับออกซิเจนที่ละลายต่ำคือปริมาณออกซิเจนเพียงพอสำหรับการเจริญเท่านั้น แต่ไม่มากเกินไปที่ทำให้เปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิก ส่วน Toyosaki และคณะ (1995) แยกเชื้อจากผลเชอรี่ พบว่า *A. xylinum* subsp.*sucrofermentans* subsp. *nov* เป็นสายพันธุ์ที่เจริญและสร้างเซลลูโลสได้สูงในภาวะเขย่า โดยไม่สร้าง 5-keto-D-gluconic จากกลูโคส

จากการรายงานของ Haigler และคณะ(1982) ว่าคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส(CMC) และอนุพันธ์อื่น(cellulose derivatives) มีผลต่อการสังเคราะห์และผลผลิตเซลลูโลสของ *A. xylinum* ดังนั้นจึงใส่สารให้ความหนืด ได้แก่ CMC , แซนแทนกัม และ คาราจีแนน ที่ความเร็วรอบการเขย่าที่ 100 รอบ/นาที เทียบกับเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวที่ไม่เติมสารให้ความหนืด (ชุดควบคุม) พบว่าการใส่สารให้ความหนืดทำให้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักได้น้อยลง เนื่องจากความหนืดที่สูงขึ้นมีผลให้การกระจายของออกซิเจนเป็นไปได้ยากขึ้น เพราะความหนืดที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการสร้างพอลิแซคคาไรด์อื่นออกมานอกเซลล์ (exopolysaccharides) นอกจากเซลลูโลส (Minakami et al,1984) Minakami และคณะ (1984) แยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติก 7 สายพันธุ์ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว แล้ววัดความหนืดพบว่าทั้ง 7 สายพันธุ์ให้ความหนืดที่แตกต่างกัน จากนั้นนำ *A. xylinum* NBI1005 มาวิเคราะห์พบว่าผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ชื่อ AM-1 ประกอบด้วย กลูโคส, กาแลคโตส, แมนโนส และ กรดกลูโคไรนิก มีอัตราส่วนโมล 6:2:1:1 วัดความหนืดได้ 754 เซนติพอยส์

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณเซลลูโลสของการเขย่าในภาวะเขย่าที่ไม่เติมสาร CMC กับที่ใส่ CMC จะเห็นว่า ปริมาณเซลลูโลสของอาหารที่ใส่ CMC มีมากกว่า เฉพาะช่วง 3 วันแรกเท่านั้น เนื่องจาก CMC ไปชักนำให้เกิดอัตราการโพลิเมอร์ไรซ์ของกลูโคสถึงร้อยละ 30 (Ben-Hayim and Ohad, 1965 ) นอกจากนั้นยังพบ CMC เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของเซลลูโลส ร้อยละ 40-45 เนื่องจากการเกิด electrostatic interaction ระหว่างหมู่ carboxymethyl ของ CMC กับ หมู่ hydroxy ของ เซลลูโลส (Tajiyama, Fujiwara, and Hayashi, 1992) แต่การที่แซนแทนกัมและคาราจีแนนไม่สามารถเพิ่มปริมาณเซลลูโลสได้ เนื่องจากแซนแทนกัม และคาราจีแนนมีสายโซ่ที่ยาว (long side chains) อาจบังหรือห่อหุ้ม glucan backbone ขณะสังเคราะห์เป็นเส้นใยเซลลูโลส ซึ่งในการสังเคราะห์สายเซลลูโลสต้องมีสาย glucan backbone ยาวพอสำหรับสร้างพันธะ

ไฮโดรเจนระหว่าง native cellulose และ อนุพันธ์ (Haigler et al., 1982) เมื่อดูลักษณะภายนอกของเซลลูโลสในอาหารน้ำมะพร้าวที่ใส่ CMC (ภาพ 21) จะเห็นว่ามีลักษณะไม่เป็นก้อนกลม (pellet) แต่จะเป็นสายของเส้นใยที่มาสานกันหลวมๆ แล้วมีเส้นใยแตกแขนงออกมาด้านข้างมากมาย ซึ่งในขั้นตอนการสังเคราะห์สายเซลลูโลส CMC จะไปเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์เซลลูโลสให้ต่างจากเดิม โดยไปขัดขวางการมัดเกลียวของไมโครไฟบริล ปกติสายไมโครไฟบริลมีขนาดความกว้าง 6-12 นาโนเมตร แต่กรณีที่ใส่ CMC ไมโครไฟบริลบางเส้นอาจมีความกว้าง 3-4 นาโนเมตร หรือน้อยกว่านั้น และไมโครไฟบริลจะมัดรวมตัวกันอย่างหลวมๆ แต่จะมีความเหนียวมาก บางครั้งไมโครไฟบริลจะพับทบกลับทิศทาง และเมื่อดูด้วย X-ray diffraction พบว่า CMC จะไปลดปริมาณ cellulose I alpha จาก 64% ให้เหลือเพียง 30% (Yamamoto and Horii, 1994)

จากข้อมูลผลการทดลองทั้งหมดนี้ สรุปได้ว่าออกซิเจนมีส่วนสัมพันธ์กับการเจริญของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 และปริมาณเซลลูโลสที่สร้างได้ เนื่องจาก เมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบที่เหมาะสม คือ 100 รอบ/นาที นาน 6 วัน จะได้เซลลูโลส 6.07 กรัม/ลิตร แต่หากหมักที่ภาวะนิ่งจะต้องเลี้ยงที่ภาชนะบรรจุขนาด 237 ตารางเซนติเมตร โดยใส่น้ำหมักสูงจากก้นภาชนะ 2.5 เซนติเมตร นานถึง 8 วัน จึงจะได้เซลลูโลส 6.06 กรัม/ลิตร ซึ่งสามารถลดระยะเวลาการผลิตได้ถึง 2 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย