

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากกากส้มโดย *Acetobacter xylinum*

Optimization of Cellulose Production from Orange Pomace by *Acetobacter xylinum*

สุภเวท มานิชยม^{*} เสถียร บุญกุ่ม สิริวัฒน์ จินศิริวานิชย์ และพัชรีย์ พัฒนากุล

Supavej Maniyom^{*}, Sathian Boonkum, Siriwat Jinsiriwanit, Patcharee Pattanagul

คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50100

Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand

* Corresponding author: Email: supavej3117@gmail.com

(Received: 6 January 2025; Revised: 13 June 2025 ; Accepted: 26 June 2025)

Abstract: The objectives of this study were to determine the optimum concentration of mannitol (3-7%) and yeast extract (0.3-0.7%) as well as the optimum shaking rate (0, 50, 100 and 150 rpm) for cellulose production from orange pomace by *Acetobacter xylinum* and to examine other qualities of bacterial cellulose and marinade. It was found that the cultivation of *A. xylinum* on medium made from orange pomace supplemented with 3% mannitol and 0.66% yeast extract gave the highest cellulose yield of 25.31 g (from 30 g of orange pomace). The addition of different amounts of mannitol and yeast extract affected the changes in color values, L*, a*, b* and moisture content of cellulose sheets, as well as reducing sugar content, soluble solids and acetic acid content of the marinade. While the optimum shaking rate was 100 rpm, the maximum cellulose yield was 42.82 g and the maximum acetic acid concentration in the marinade was found to be 2.93 g/L at the shaking rate of 50 rpm.

Keywords: Orange pomace, *Acetobacter xylinum*, cellulose, marinade

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ในการศึกษาในครั้งนี้คือ ต้องการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลแมนนิทอล (3-7 เปอร์เซ็นต์) และยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ (0.3-0.7 เปอร์เซ็นต์) รวมถึงอัตราการเขย่าที่เหมาะสม (0, 50, 100 และ 150 รอบต่ออนาที) ในการผลิตเซลล์ลูโลสจากกากส้มโดย *Acetobacter xylinum* และตรวจคุณภาพด้านอื่น ๆ ของเซลล์ลูโลสและน้ำหมัก โดยพบว่า การเลี้ยง *A. xylinum* จากอาหารที่ทำจากกากส้มที่เติมน้ำตาลแมนนิทอล 3 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ 0.66 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ปริมาณเซลล์ลูโลสสูงสุดเท่ากับ 25.31 กรัม(จากกากส้ม 30 กรัม) การเติมน้ำตาลแมนนิทอลและยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ในปริมาณที่แตกต่างกันส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าสี L^* , a^* , b^* และปริมาณความชื้นของแผ่นเซลล์ลูโลส ที่ได้รวมถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าของแข็งที่ละลายได้ และปริมาณกรดอะซิติกของน้ำหมัก ในขณะที่อัตราการเขย่าที่เหมาะสมคือ 100 รอบต่ออนาที โดยได้ปริมาณเซลล์ลูโลสสูงสุดเท่ากับ 42.82 กรัม และพบว่าได้ความเข้มข้นกรดอะซิติกในน้ำหมักสูงสุด 2.93 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเขย่า 50 รอบต่ออนาที

คำสำคัญ: กากส้ม, *Acetobacter xylinum*, เซลล์ลูโลส, น้ำหมัก

บทนำ

วุ้นสวรรค์ (NATA de coco) จัดเป็นโพลีแซคคาไรด์จำพวกใยอาหาร (dietary fiber) อยู่ในกลุ่มของเซลล์ลูโลส สามารถนำมาแปรรูปเป็นอาหารคาวหวานได้หลายชนิด เช่น วุ้นลอยแก้ว รวมมิตร เยลลี่ เนื้อปลาหมึกเทียม แมงกะพรุนเทียม และอื่น ๆ (Monmai, 2025) การผลิตวุ้นสวรรค์โดยทั่วไปเกิดจากกระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดน้ำส้ม (acetic acid bacteria) ได้แก่ *Acetobacter xylinum* ซึ่งในกระบวนการนี้ทำให้ได้น้ำหมัก (marinade) ที่มีรสเปรี้ยวสามารถนำมาผลิตเป็นน้ำส้มสายชูหมักได้ วัตถุประสงค์ที่นำมาใช้เพื่อผลิตวุ้นสวรรค์คือน้ำมะพร้าวจากผลมะพร้าวแก่ หรือน้ำผลไม้ชนิดต่าง ๆ มาทดแทนได้ วุ้นสวรรค์มีลักษณะเป็นวุ้นลอยอยู่ด้านบนของภาชนะหมัก และมีน้ำหมักที่มีฤทธิ์เป็นกรดอยู่ด้านล่าง ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะซิติกที่มีรสเปรี้ยว (Promwongpo *et al.*, 2017)

ปัจจุบันวุ้นสวรรค์ผลิตจากวัตถุดิบหลากหลายชนิด เช่น น้ำสับปะรด น้ำกะทิ น้ำหางนม (whey) น้ำแอปเปิ้ล น้ำสาลี่ น้ำองุ่น การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ลูโลสที่ผลิตได้จากการหมักของจุลินทรีย์ *A. xylinum* จากการใช้วัตถุดิบที่แตกต่างกัน พบว่าการใช้น้ำส้มเป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักวุ้นสวรรค์ ทำให้ได้ปริมาณวุ้นสวรรค์สูงสุดเท่ากับ 0.65 กรัมจากน้ำส้มทั้งหมด 100 กรัม (Kurosumi, 2009) ทั้งนี้ยังมีการนำ

น้ำเสียจากกระบวนการแปรรูปสับปะรดมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตวุ้นสวรรค์อีกด้วย (Moukamnerd *et al.*, 2018) อย่างไรก็ตาม การผลิตวุ้นสวรรค์และน้ำส้มสายชูหมักให้ได้ปริมาณสูง ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน อาหารเสริม ชนิดสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และสภาวะที่ใช้ในการหมัก เป็นต้น (Khemacheewakul, 2017)

โดยทั่วไปแหล่งคาร์บอนที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเซลล์ลูโลสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *A. xylinum* คือ กลูโคส นอกจากนี้ เซลล์ลูโลสยังสังเคราะห์ได้จากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ เช่น กลุ่มน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอนจำนวน 5 หรือ 6 อะตอม โอลิโกแซคคาไรด์ สตาร์ช แอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ เป็นต้น (Khemacheewakul, 2017) Mohammadkazemi *et al.* (2015) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตวุ้นสวรรค์ จากน้ำตาลแมนนิทอล ซูโครส น้ำเชื่อม อินทผลัม และกลูโคส พบว่า การใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ได้ปริมาณผลผลิตวุ้นสวรรค์สูงสุด อย่างไรก็ตามปริมาณที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไป ในสูตรอาหารด้วย Boonpan *et al.* (2010) ผลิตเซลล์ลูโลสจาก *A. xylinum* โดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ พบว่า แบคทีเรียสามารถสร้างแผ่นเซลล์ลูโลสได้ดีในกากน้ำตาลที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (total soluble solid) 12 องศาบริกซ์ พีเอช 5.0 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.7 และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยใช้ระยะเวลาใน

การหมัก 12 วัน ซึ่งทำให้ได้แผ่นเซลล์ที่มีความหนาเท่ากับ 1.61 เซนติเมตร และน้ำหนักเท่ากับ 96.29 กรัม (จากกากน้ำตาลที่มีค่าของแข็งที่ละลายได้ 65 องศาบริกซ์ ปริมาตร 37 มิลลิลิตร)

นอกจากนี้ยังได้มีการนำน้ำมะม่วงสายพันธุ์น้ำดอกไม้มาใช้เป็นแหล่งอาหารในการ *A. xylinum* TISTR 975 และหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมัก พบว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 8 องศาบริกซ์ ค่าพีเอช 4.0 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.5 (มวลต่อปริมาตร) และหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตวันสวรรคต โดยหลังการหมัก 10 วัน สามารถผลิตเซลล์ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 43.83 กรัม (เทียบกับใช้มะม่วงน้ำดอกไม้ 15 กรัม) และได้ความหนาเท่ากับ 5.05 มิลลิเมตร (Promwongpo *et al.*, 2017) Yodsuan *et al.* (2012) ศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตวันสวรรคต พบว่า การเติมน้ำตาลแมนนิทอลร้อยละ 5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 975 ทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตเซลล์ได้สูงสุด (เพิ่มมากขึ้นเป็น 5 เท่าเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรควบคุม) รองลงมาคือน้ำตาลฟรุกโตส (เพิ่มขึ้น 3 เท่าของอาหารสูตรควบคุม) และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ (yeast extract) ซึ่งใช้ปริมาณร้อยละ 1.0 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ได้ปริมาณผลผลิตวันสวรรคตสูงสุด

สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตวันสวรรคตอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส *A. xylinum* สามารถเจริญและสร้างเซลล์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (Lahiri *et al.*, 2021) นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มปริมาณออกซิเจนในระหว่างกระบวนการเลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าส่งผลต่อการผลิตเซลล์ โดยพบว่า การเพิ่มความเร็วการเขย่าจาก 50 เป็น 150 รอบต่อนาที ทำให้ปริมาณของกรดกลูโคนิกในน้ำหมักเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณเซลล์ลดลง (Tantratian *et al.*, 2005)

งานวิจัยฉบับนี้มีวัตถุประสงค์ในการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบเหลือทิ้งจากการนำเปลือกส้มรวมกากใย (orange pomace) ที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์มาแปรรูปเป็น

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *A. xylinum* ที่เมื่อนักวิจัยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อโดยการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้แก่ น้ำตาลแมนนิทอล และยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ ตามลำดับ รวมถึงศึกษาอัตราการเขย่าในระหว่างกระบวนการหมักเชื้อ เพื่อให้ได้เซลล์และน้ำหมักที่มีปริมาณและคุณภาพดีที่สุด และสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อให้เกิดการเพิ่มมูลค่าสินค้าจากเศษวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ *Acetobacter xylinum* จากสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะอุตสาหกรรม-เกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วย น้ำมะพร้าว 500 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร กลูโคส 50 กรัม ยีสต์สกัด 10 กรัม ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 1 กรัม กรดซิตริก 1.5 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม และเติมเอทานอล 3.5 เปอร์เซ็นต์ (ปรับปรุงจาก Coconut water glucose media, Alsawehli *et al.*, 2021) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน สำหรับใช้เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากส้มต่อไป

2. วัตถุดิบกากส้ม

ส้มสายน้ำผึ้งจากสวนส้มวังกานิล ตำบลแม่สาว อำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงใหม่ นำกากส้มที่เหลือจากการคั้นน้ำ มาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (Tray dryer, Semon, SI-CO12G, USA) แล้วจึงนำมาบดละเอียดให้เป็นผง (Braun, K750, Germany) ใช้ตะแกรงร่อนขนาด 10 เมช (Sieve Shaker, Endecotts, OCTAGON 200, England) ร่อนให้ได้ผงที่ละเอียด นำกากส้มผงที่ได้บรรจุลงถุงปิดผนึกและเก็บไว้ในที่แห้ง

3. อาหารเลี้ยงเชื้อจากกากส้ม

นำกากส้มผง 300 กรัม ผสมน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสปริมาณ 1.5 ลิตร กรนผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาณของแข็งให้ได้ 10 องศาบริกซ์ด้วยน้ำกลั่น นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4800 รอบ

ต่อนาที นาน 15 นาที (Hettich Universal, รุ่น 320R, Germany) เทส่วนผสม 150 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ (เทียบเท่ากับใช้กากส้ม 30 กรัม) จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ แมงนิทอล (3-7 เปอร์เซ็นต์) และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ (0.3-0.7 เปอร์เซ็นต์) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนเติมกากส้มที่อุณหภูมิ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เมื่อครบกำหนดให้แยกแผ่นเซลล์ลูลิสที่ลอยอยู่ด้านบนออกจากน้ำหมัก แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ต่อไป

4. แผนการทดลอง

4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมงนิทอล (3-7 เปอร์เซ็นต์) และยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ (0.3-0.7 เปอร์เซ็นต์) ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากส้ม วางแผนการทดลองแบบ Factorial experiment in central composite design วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) วิเคราะห์พื้นที่ที่ตอบสนองด้วยวิธี response surface methodology และคำนวณค่าที่เหมาะสมจากการ optimization ด้วยโปรแกรม Minitab

4.2 การหาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *A. xylinum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากส้ม วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติด้วยวิธี ANOVA โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Tukey method ด้วยโปรแกรม Minitab

5. การวิเคราะห์ผล

5.1 วิเคราะห์ค่าทางกายภาพ ได้แก่ น้ำหนักเซลล์ลูลิส น้ำหนักน้ำหมัก (Sartorius, Oerting, England) ค่าสีของวุ้น L*, a*, b* ค่าสีของน้ำหมัก L*, a*, b* (Konica, Minolta, CR-400, Japan)

5.2 วิเคราะห์ค่าทางเคมี ได้แก่ ค่าพีเอช (Benchtop, Horiba F22, USA) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Atago, PAL-Easy Acid181, Japan) ค่าความชื้นทั้งหมด (Camilo *et al*, 2025) และปริมาณกรดอะซิติก-วิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก (ปรับปรุงจาก Zaky *et al.*, 2017) ด้วยเครื่อง HPLC (Agilent Technologies, 1260 Infinity, USA) โดยใช้ น้ำหมักปริมาตร 5 ไมโครลิตร ฉีดผ่านคอลัมน์ Agilent Hi-Plex H column (7.7 x 300 mm, 8 micron) ใช้ตัวทำละลายกรดซัลฟูริก 5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราการไหลเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที กำหนดระยะเวลา 27 นาทีต่อตัวอย่างวิเคราะห์ และเวลาที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 16.1-16.2 นาที โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและตัวอย่างน้ำหมักที่ตรวจวิเคราะห์กรดอะซิติกแสดงใน Figure 1

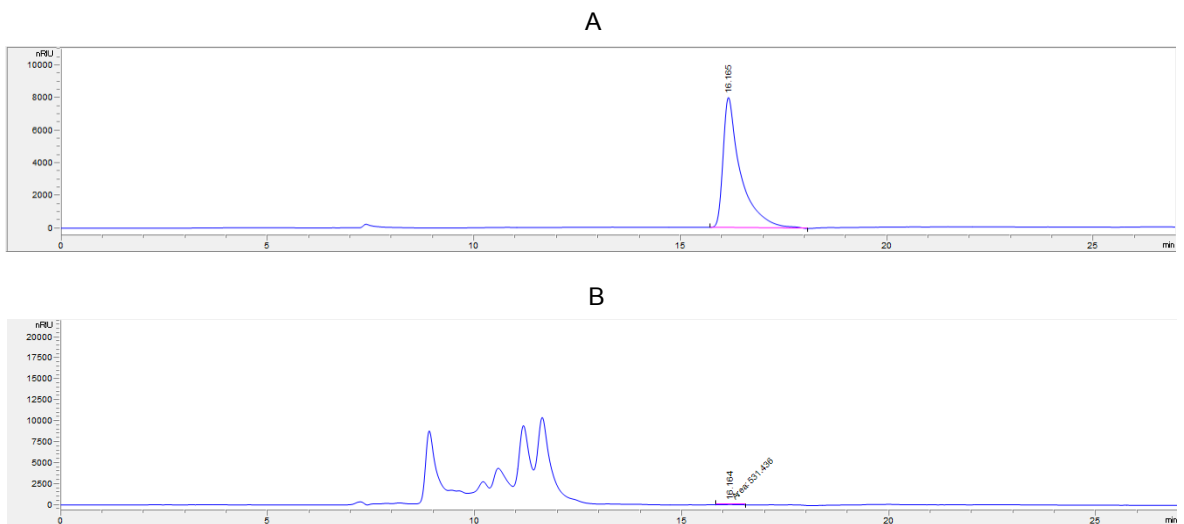


Figure 1. Chromatogram of acetic acid standard (A) and marinade sample (B)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาในระดับการเติมน้ำตาลแมนนิทอลปริมาณ 3-7 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ปริมาณ 0.3-0.7 เปอร์เซ็นต์ พบว่า น้ำตาลแมนนิทอลและยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ น้ำหนักเซลลูโลส ค่าสี L^* , a^* และ b^* ของแผ่นเซลลูโลส (Figure 2-5) ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ ค่าของแข็งที่ละลายได้ ปริมาณความชื้น และกรดอะซิติก (Figure 6-9)

จาก Figure 2 พบว่า การเติมน้ำตาลแมนนิทอลในระดับต่ำร่วมกับยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ในระดับสูงส่งผลให้การผลิตเซลลูโลสได้ในปริมาณเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากสมการใน Table 1 ได้ค่าจากการคำนวณ (predicted value) ของปริมาณเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 25.31 กรัม เมื่อใช้แมนนิทอล 3 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ 0.66 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้การเติมน้ำตาลแมนนิทอลที่สูงขึ้น ส่งผลให้แบคทีเรียใช้น้ำตาลผลิตเป็นกรดได้เพิ่มขึ้น (Figure 9) เมื่อมีกรดในปริมาณสูงทำให้สภาวะการหมักวันสวรรคไม่เหมาะสมและผลิตเซลลูโลสได้น้อยลง (Khemacheewakul, 2017) อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาณยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ส่งผลให้การผลิตเซลลูโลสได้มากขึ้น (Figure 2) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ

งานวิจัยของ Yodsuwan *et al.* (2012) โดยการเพิ่มปริมาณแหล่งไนโตรเจนให้กับเชื้อจุลินทรีย์ส่งผลต่อปริมาณการผลิตสารเมตาโบไลต์ ทั้งนี้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนยังเป็นปัจจัยที่สำคัญในการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* อีกด้วย (Zhang *et al.*, 2016)

ค่าสี L^* , a^* และ b^* ของแผ่นเซลลูโลสแปรผันตามปริมาณการเติมน้ำตาลแมนนิทอลและยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ (Figure 3-5) ซึ่งการเติมน้ำตาลแมนนิทอล 3-7 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ 0.3-0.7 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ค่าสี L^* , a^* และ b^* มีค่าอยู่ในช่วง 44.34-52.82, 0.65-4.59 และ 14.04-21.58 ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้เมื่อนำมาสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาตาลแมนนิทอล ยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ และค่าสี พบว่า ค่าความสว่าง (L^* value) สูงที่สุดเท่ากับ 52.47 เมื่อเติมน้ำตาล 4.09 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ 0.41 เปอร์เซ็นต์ ค่าสีแดง (a^* value) สูงที่สุดเท่ากับ 4.42 เมื่อเติมน้ำตาล 6.07 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ปริมาณ 0.70 เปอร์เซ็นต์ และค่าสีเหลือง (b^* value) สูงที่สุดเท่ากับ 21.37 เมื่อเติมน้ำตาล 5.13 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ 0.70 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

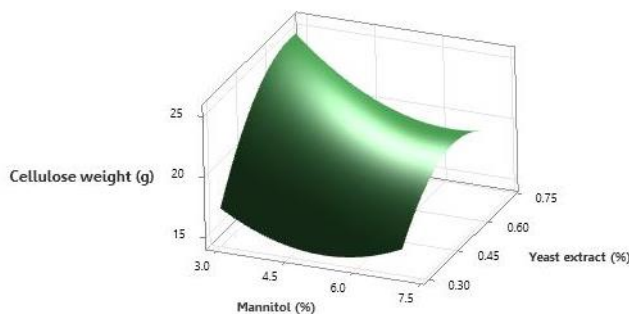


Figure 2. Effects of mannitol and yeast extract on cellulose weight of cellulose

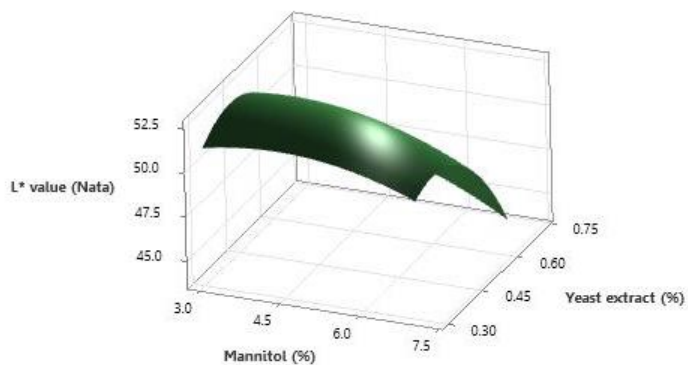


Figure 3. Effects of mannitol and yeast extract on L* value of cellulose

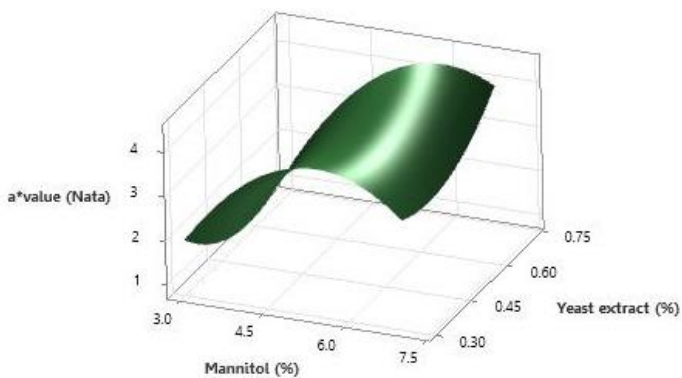


Figure 4. Effects of mannitol and yeast extract on a* value of cellulose

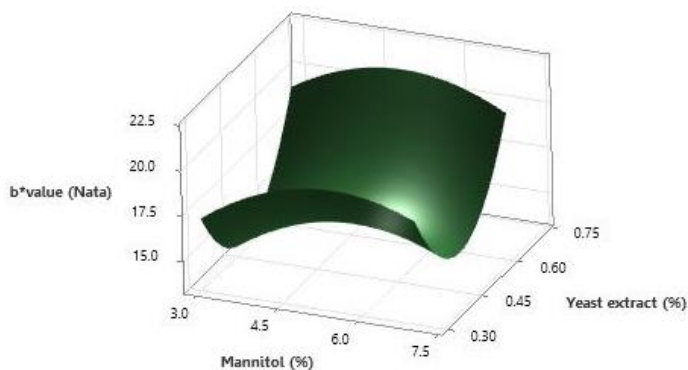


Figure 5. Effects of mannitol and yeast extract on b* value of cellulose

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น (Figure 6) จากสมการใน Table 1 สามารถคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดได้ 29.77 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้จากการเติมน้ำตาลแมนนิทอล 7.0 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ 0.7 เปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำหมัก (total soluble solid) พบว่าการเติมน้ำตาลแมนนิทอลเพิ่มขึ้นจาก 3 ถึง

7 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลแมนนิทอลเป็นน้ำตาลที่สามารถละลายได้ในน้ำ (Shrivastava *et al.*, 2021) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณของน้ำตาลจึงทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้เพิ่มสูงขึ้นนั่นเอง (Figure 7) โดยค่าปริมาณของแข็งที่วัดได้อยู่ในช่วง 13-16 องศาบริกซ์

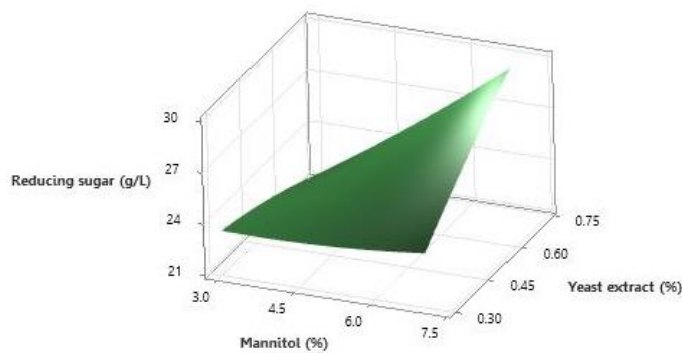


Figure 6. Effects of mannitol and yeast extract on reducing sugar content (g/l) of marinade

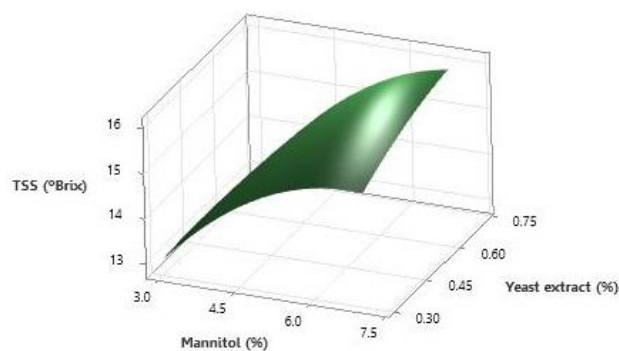


Figure 7. Effects of mannitol and yeast extract on total soluble solid (°Brix) of marinade

เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลแมนนิทอลสูงขึ้นทำให้ความชื้นของเซลล์ลดลงต่ำลง (Figure 8) ทั้งนี้เกิดจากน้ำตาลแมนนิทอลจัดเป็นสารดูดความชื้นต่ำมาก (low hygroscopicity) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณน้ำตาลแมนนิทอลจึงส่งผลให้ความชื้นของผลิตภัณฑ์มีค่าต่ำลง (Higuchi *et al.*, 2014) โดยความชื้นที่วัดได้อยู่ในช่วง 82.20-89.05 เปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณกรดอะซิติกของน้ำหมักเปลี่ยนแปลงไปตามปริมาณน้ำตาลแมนนิทอลและยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

(Figure 9) โดยพบว่า การเติมน้ำตาลแมนนิทอล 5.38 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ 0.34 เปอร์เซ็นต์ สามารถคำนวณค่ากรดอะซิติกของน้ำหมักได้สูงสุดเท่ากับ 0.77 กรัมต่อลิตร (Table 1) โดยทั้งนี้มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำส้มสายชู กำหนดให้น้ำส้มสายชูหมักต้องมีกรดอะซิติกไม่น้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ (มอก. 83-2527) ดังนั้นจากการผลิตน้ำหมักด้วยอาหารจากสั้มีที่การเติมแมนนิทอลและยีสต์เอ็กซ์แทรกท์สามารถนำไปแปรูปเป็นน้ำส้มสายชูหมักได้

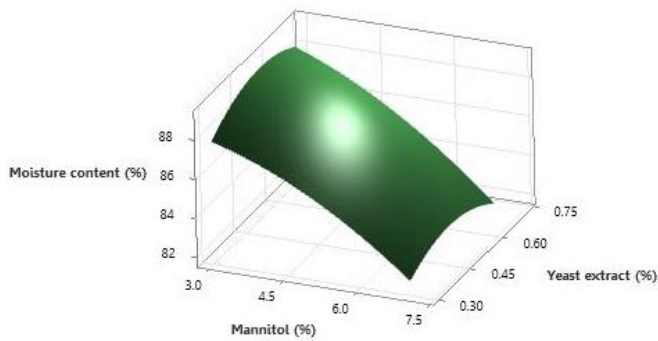


Figure 8. Effects of mannitol and yeast extract on moisture content of cellulose

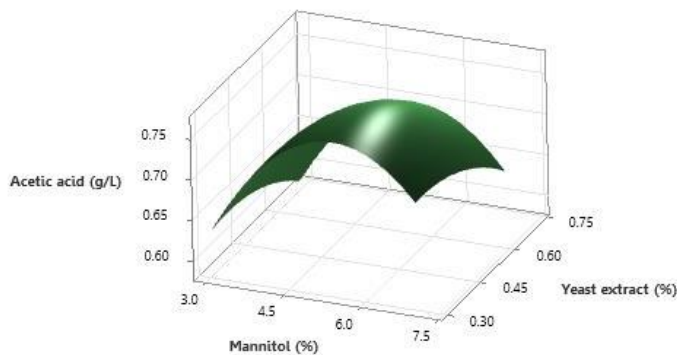


Figure 9. Effects of mannitol and yeast extract on acetic acid content (g/l) of marinade

Table 1. Regression equation and maximum predicted value of dependent variables on optimization process by using Minitab

Regression equation	R ²	Mannitol	Yeast extract	Predicted value
Cellulose yield (g) = 7.2-(4.41*A)+(89.4*B) +(0.503*A*A)-(60.7*B*B)-(2.91*A*B)	0.7538	3	0.66	25.31
Cellulose L*value = 35.4+(2.48*A)+(58.6*B) -(0.235*A*A)-(64.3*B*B)-(1.39*A*B)	0.8032	4.09	0.41	52.47
Cellulose a*value = -1.78+(3.48*A)-(19.4*B) -(0.350*A*A)+(14.0*B*B)+(1.11*A*B)	0.7382	6.07	0.70	4.42
Cellulose b*value = 28.40+(4.99*A)-(106.0*B) -(0.432*A*A)+(114.0*B*B)-(0.81*A*B)	0.9418	5.13	0.70	21.37
Reducing sugar (g/L) = 29.0-(1.86*A)-(14.8*B) +(0.056*A*A)-(4.5*B*B)+(4.82*A*B)	0.7133	7.0	0.70	29.77
TSS (°Brix) = 8.10+(1.933*A)+(1.00*B) -(0.1579*A*A)-(3.29*B*B)+(0.625*A*B)	0.9836	7.0	0.70	16.04
Cellulose moisture content (%w/w) = 82.18+(0.53*A)+(27.6*B)-(0.175*A*A) -(24.4*B*B)-(0.57*A*B)	0.9279	3.0	0.53	89.06
Acetic acid (g/l) = 0.011+(0.252*A) +(0.397*B) -(0.0232*A*A)-(0.466*B*B)-(0.0150*A*B)	0.8384	5.38	0.34	0.77

The letters of A means mannitol and B means yeast extract

ดังนั้นจึงทำการผลิตเซลลูโลสจากอาหารเลี้ยงเชื้อกากส้มที่มีการเติมน้ำตาลแมนนิทอลและยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ 3 เปอร์เซ็นต์ และ 0.66 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เพื่อให้ *A. xylinum* สามารถสร้างเซลลูโลสได้สูงที่สุด อย่างไรก็ตาม *A. xylinum* เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (Khemacheewakul, 2017) การเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าจึงเป็นการเติมอากาศให้กับเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งในการทดลองนี้ศึกษาอัตราการเขย่าที่ 0, 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที ผลจากการทดลองพบว่า การเลี้ยงเชื้อโดยใช้การเขย่าที่ความเร็วรอบแตกต่างกันส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลลูโลส ค่าสีของเซลลูโลส รวมถึงค่าสี ค่าพีเอช ปริมาณกรดอะซิติก ค่าความชื้น และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำหมัก

เมื่อทำการวัดปริมาณเซลลูโลสจากตัวอย่างที่เขย่าด้วยความเร็วรอบที่ต่างกัน พบว่า การเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ทำให้ได้ปริมาณเซลลูโลสสูงที่สุดเท่ากับ 42.82 กรัมต่อกากส้ม 30 กรัม (Figure 10) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tantratian *et al.* (2005) ที่ศึกษาผลของออกซิเจนที่ละลายในอาหารน้ำมะพร้าวต่อการสร้างเซลลูโลสของ *A. xylinum* โดยได้ผลเช่นเดียวกันคือที่ระดับความเร็ว 100 รอบต่อนาที เชื้อผลิตเซลลูโลสสูงที่สุดเท่ากับ 2.67 กรัมต่อลิตรของน้ำมะพร้าว การเพิ่มอัตราเร็วในการเขย่าจะทำให้ปริมาณออกซิเจนสูงขึ้นแต่พบว่าทำให้ปริมาณกรดกลูโคนิกในแหล่งอาหารเพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่งในสภาวะดังกล่าวส่งผลให้มีการสร้างเซลลูโลสได้ลดลง ดังนั้นอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* บนอาหารกากส้มคือ 100 รอบต่อนาที

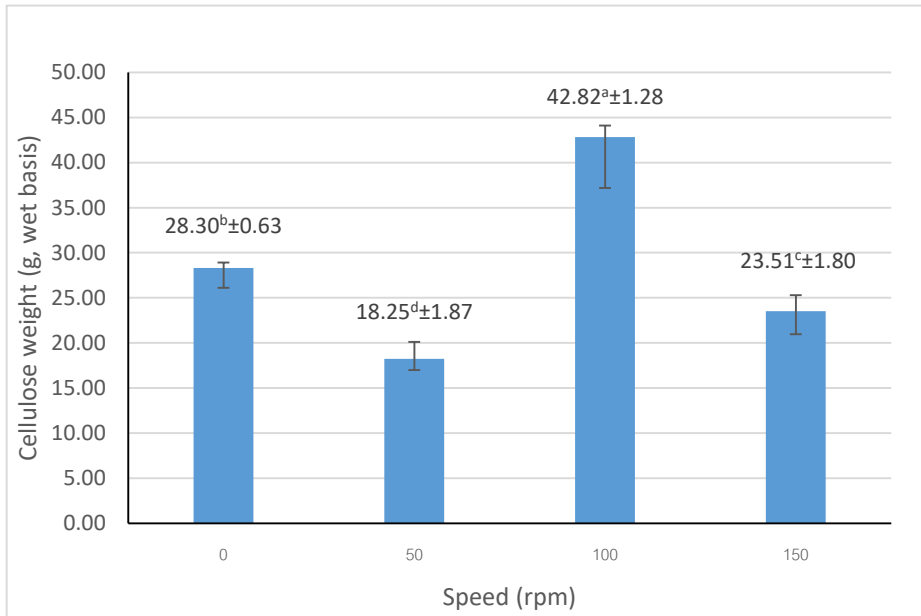


Figure 10. Effects of shaking speed (rpm) on cellulose weight (g)

Mean within the bar graph followed by different letters are significantly different at $p \leq 0.05$

ค่าสี L^* , a^* และ b^* ของแผ่นเซลลูโลสและน้ำหมักมีการเปลี่ยนแปลงตามอัตราความเร็วรอบในการเขย่า (Figure 11 และ 12) โดยเมื่อทำการวัดสีในแผ่นเซลลูโลส พบว่า ค่าความสว่าง (L^* value) สูงสุดเท่ากับ 53.53 ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า (0 รอบต่อนาที) ส่วนค่าสีแดง (a^* value) สูงสุดของผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นที่อัตราการเขย่า 50 และ 100 รอบต่อนาที ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.09 และ 6.33 ตามลำดับ สำหรับค่าสีเหลือง (b^* value) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 26.91 ที่อัตราการเขย่า 50 รอบต่อนาที ในขณะที่การตรวจวัดค่าสีของน้ำหมักพบว่า ค่าความสว่าง (L^* value) สูงสุดเท่ากับ 72.20 และ 69.16 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่แบบไม่เขย่า และแบบเขย่าที่อัตรา 50 รอบต่อนาที ตามลำดับ สำหรับค่าสีแดง (a^* value) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 8.58 ที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที และค่าสีเหลือง (b^* value) สูงที่สุดเท่ากับ 49.84 ที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 0 (ไม่เขย่า) และค่าสีเหลืองลดลงเรื่อย ๆ เมื่ออัตราการเขย่าเพิ่มมากขึ้น และมีค่าน้อยที่สุดเท่ากับ 20.67 เมื่ออัตราการเขย่าเท่ากับ 150 รอบต่อนาที

เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณกรดอะซิติกทั้งหมดในน้ำหมัก พบว่า การเขย่าที่อัตรา 50 รอบต่อนาที ส่งผลให้น้ำหมักมีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดเท่ากับ 2.93 กรัมต่อลิตร การเพิ่มการเขย่าที่อัตรา 150 รอบต่อนาทีทำให้ได้กรดอะซิติกในปริมาณต่ำที่สุดเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร (Figure 13) ค่าความชื้นของเซลลูโลสอยู่ในช่วง 84.28-88.89% (Figure 14) ค่าพีเอชและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำหมักที่เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าด้วยอัตราเร็ว 0-150 รอบต่อนาที วัดได้อยู่ช่วง 4.34-4.67 และ 22.42-27.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Figure 15 และ 16)

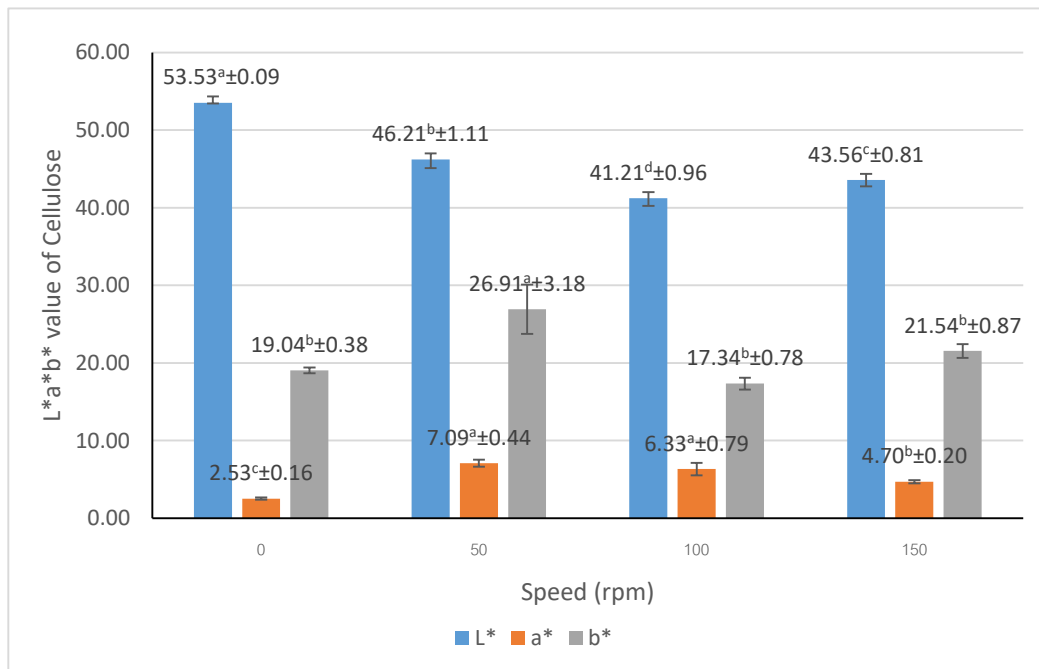


Figure 11. Effects of shaking speed (rpm) on L*, a* and b* value of cellulose

Mean within the bar graph followed by different letters are significantly different at $p \leq 0.05$

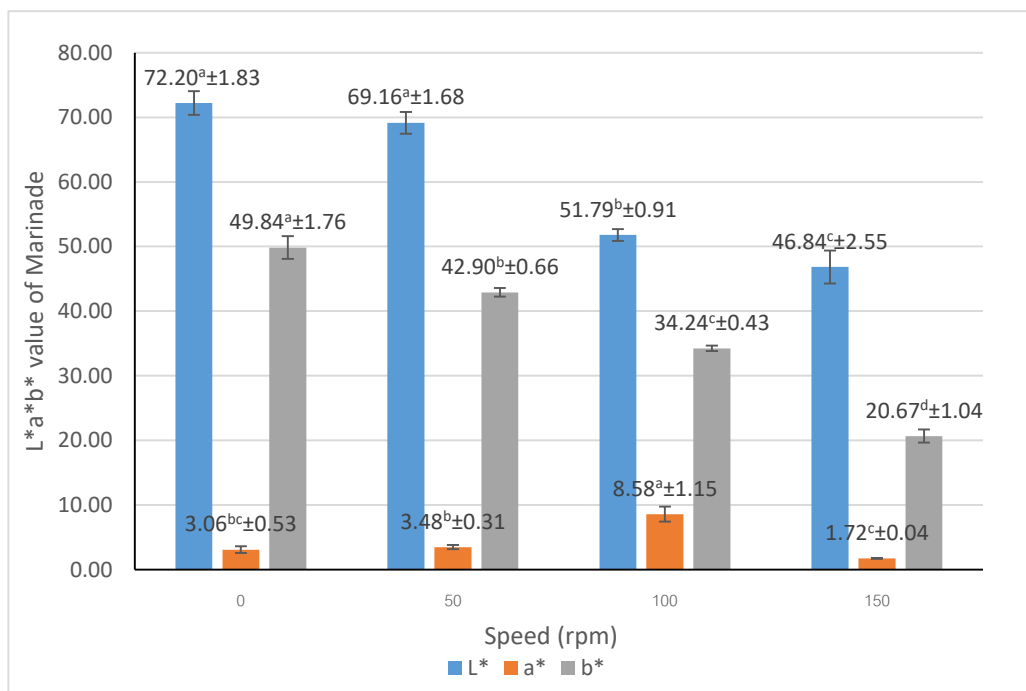


Figure 12. Effects of shaking speed (rpm) on L*, a* and b* value of marinade

Mean within the bar graph followed by different letters are significantly different at $p \leq 0.05$

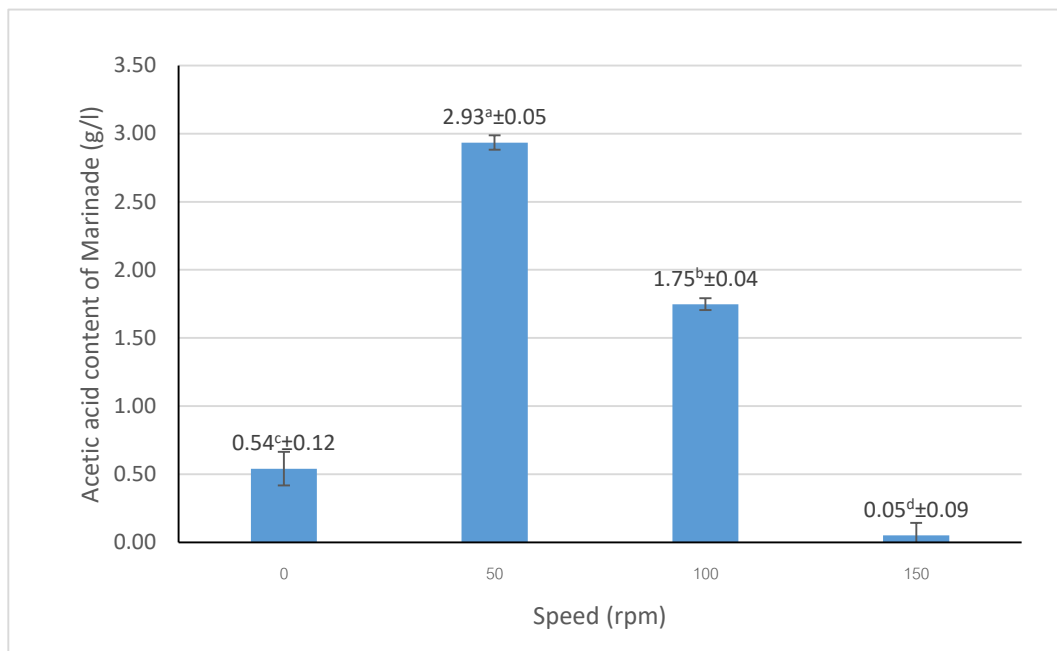


Figure 13. Effects of shaking speed (rpm) on acetic acid (g/l) of marinade
Mean within the bar graph followed by different letters are significantly different at $p \leq 0.05$

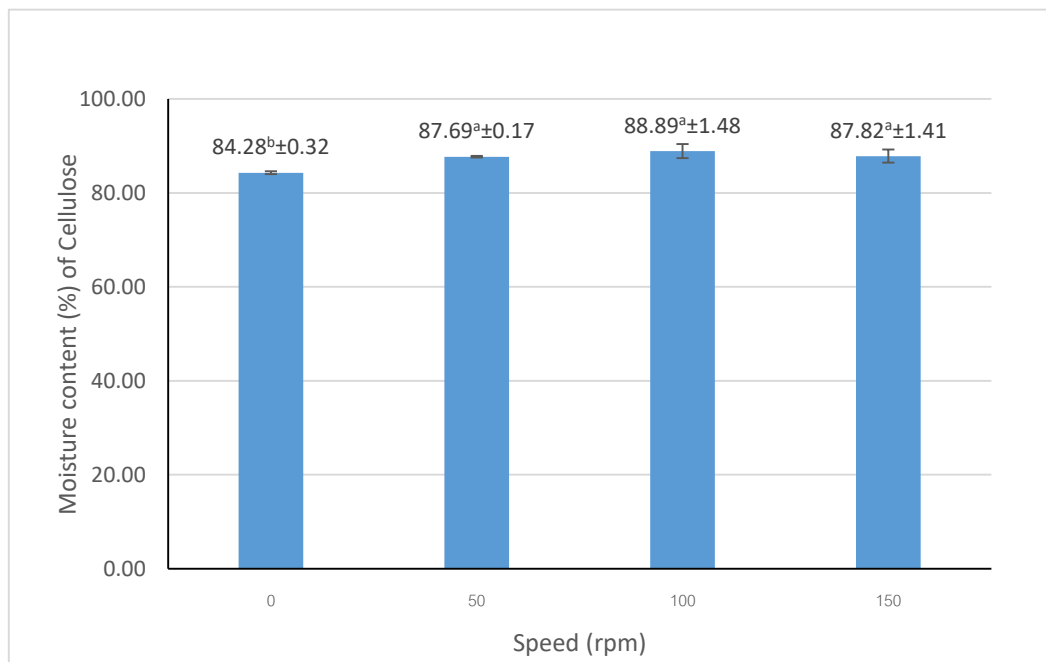


Figure 14. Effects of shaking speed (rpm) on moisture content (%) of cellulose
Mean within the bar graph followed by different letters are significantly different at $p \leq 0.05$

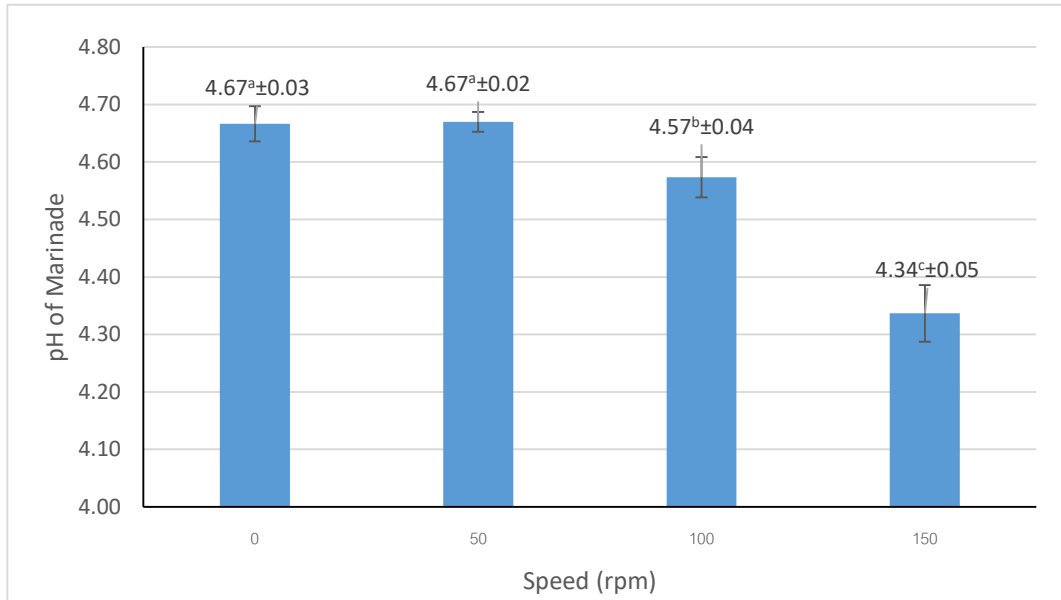


Figure 15. Effects of shaking speed (rpm) on pH of marinade

Mean within the bar graph followed by different letters are significantly different at $p \leq 0.05$

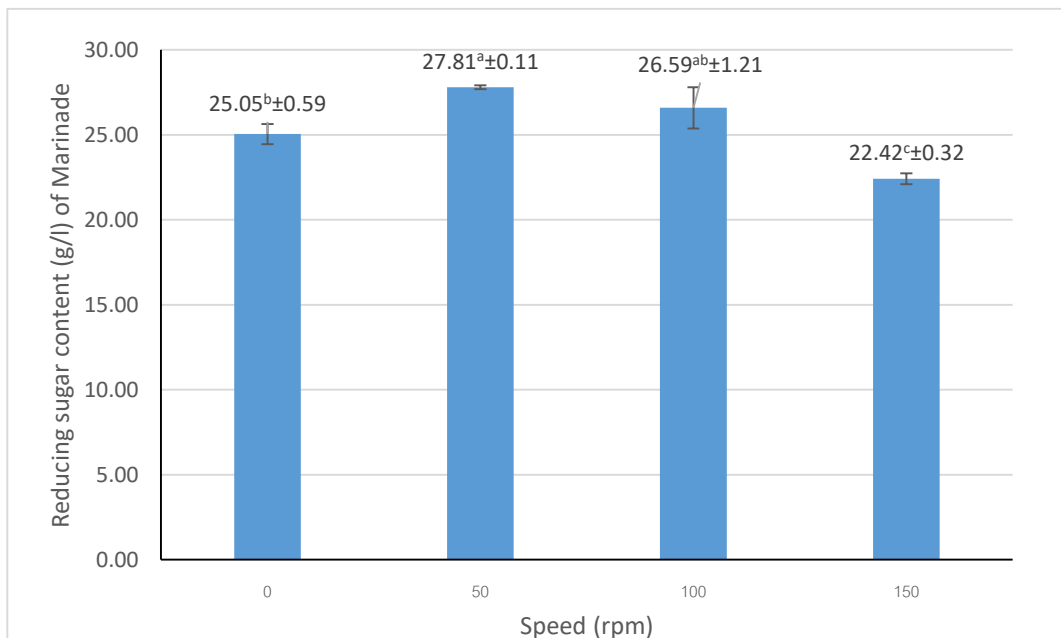


Figure 16. Effects of shaking speed (rpm) on reducing sugar (g/l) of marinade

Mean within the bar graph followed by different letters are significantly different at $p \leq 0.05$

สรุป

จากการศึกษาการเติมน้ำตาลแมนนิทอล และยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ลงในอาหารกากส้มในปริมาณ 3-7 เปอร์เซ็นต์ และ 0.3-0.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า *A. xylinum* สามารถสร้างเซลลูโลสได้ปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 25.31 กรัม เมื่อใช้อาหารกากส้ม 30 กรัม ที่เติมน้ำตาลแมนนิทอล 3 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ 0.66 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลแมนนิทอล และยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าสี L^* , a^* และ b^* ของแผ่นเซลลูโลส รวมถึงน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ค่าความชื้น และปริมาณกรดอะซิติกของน้ำหมัก เมื่อทำการศึกษาอัตราการเขย่าที่ 0, 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที พบว่า การเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ทำให้ได้ปริมาณเซลลูโลสสูงที่สุดเท่ากับ 42.82 กรัม ในขณะที่การเขย่าด้วยอัตราเร็ว 50 รอบต่อนาที ทำให้น้ำหมักมีปริมาณกรดอะซิติกสูงที่สุดเท่ากับ 2.93 กรัมต่อลิตร การเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่าและแบบเขย่า ยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าสี L^* , a^* , b^* ของทั้งแผ่นเซลลูโลสและน้ำหมัก รวมถึงปริมาณกรดอะซิติก ค่าพีเอช ปริมาณความชื้น และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำหมักอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนด้านวัสดุดิบจาก สวนส้มวังกานิล จังหวัดเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

- Alsawehli, A.O., M.S. Kalil, S.M. Alburki, and J.K. Alfeluo. 2021. Production of bacterial cellulose from coconut water as a medium by using *Acetobacter xylinum* strain. Humanitarian and Natural Sciences Journal 2(11): 125-140.
- Boonpan, A., S. Pongswat and C. Khampa. 2010. Study on the optimum condition for nata production from Molasses. pp. 547-554. In: Proceedings of 48th Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Camilo, M.O., R.F. Carvalho, A.B.S. Costa, E.F.C. Junior, A.O.S. Costa and R.C. Sousa. 2025. Drying kinetic for moisture content prediction of peels Tahiti lemon (*Citrus latifolia*): Approach by machine learning and optimization – genetic algorithms and nonlinear programming. South African Journal of Chemical Engineering 51: 136-152.
- Higuchi, M., S. Tanaka, K. Tamura and Y. Sakata. 2014. Hygroscopicity of a sugarless coating layer formed by the interaction between mannitol and poly(vinyl alcohol) (PVA). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 123: 557-565.
- Khemacheewakul, J. 2017. Factors affecting production of cellulose by *Acetobacter* sp. and fermentation technology. RMUTSB Academic Journal 5(1): 91 - 103. (in Thai)
- Kurosumi, A., C. Sasaki, Y. Yamashita and Y. Nakamura. 2009. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. Carbohydrate Polymers 76(2): 333-335.
- Lahiri, D., M. Nag, B. Dutta, A. Dey, T. Sarkar, S. Pati, H.A. Edinur, Z.A. Kari, N.H.M. Noor and R.R. Ray. 2012. Bacterial cellulose: Production, characterization, and application as antimicrobial agent. Molecular Sciences 22(23): 1-18.

-
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3): 426-428.
- Mohammadkazemi, F., M. Azin and A. Ashori. 2015. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate polymers* 117: 518-523.
- Monmai. 2025. Coconut jelly production (heavenly jelly) adds value through fermentation. (Online) . Available: <https://www.monmai.com/heavenlyjelly>. (June 9, 2025). (in Thai)
- Moukamnerd, C., S. Saenchang, A. Krutjan and C. Techapun. 2018. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* using wastewater from pineapple processing as a carbon source. *Khon Kaen Agriculture Journal* 46(3): 581-590. (in Thai)
- Promwongpo, C., W. Yokhanit and J. Khemacheewakul. 2017. A study of the optimal fermentation conditions for nata de coco production by *Acetobacter xylinum* TISTR975 from mango juice. *KMUTT Research and Development Journal* 40(2): 271 - 282. (in Thai)
- Shrivastava, A., S. Sharma, M. Kaurav and A. Sharma. 2021. Characteristics and analytical methods of Mannitol: An update. *International Journal of Applied Pharmaceutics* 13(5): 20-32.
- Tantratian, S., P. Tammarate, W. Krusong, P. Bhattarakosol and A. Phusri. 2005. Effect of dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter* sp. *Journal of Scientific Research* 30(2): 179-186.
- Thai Industrial Standard. 83-2527. National Food Institute Thailand.
- Yodsuwan, N., A. Owatworakit, A. Ngaokla, N. Tawichai and N. Soykeabkaew. 2012. Effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production for bionanocomposite materials. pp. 1 - 6. *In: Proceedings of 1st Mae Fah Luang University International Conference: Mae Fah Luang University, Chiang Rai.* (in Thai)
- Zaky, A.S., N. Pensupa, A. Andrade-Eiroae, G.A. Tucker and C. Du. 2017. Anew HPLC method for simultaneously measuring chloride, sugar, organic acids and alcohols in food samples. *Journal of Food Composition and Analysis* 56: 25-33.
- Zhang, H., C. Chen, C. Zhu and D. Sun. 2016. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum*: Effects of carbon/nitrogen-ratio on cell growth and metabolite production. *Cellulose Chemical and Technology* 50(9-10): 997-1003.
-