# การพัฒนาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในกากน้ำตาลโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริมและการเติมสารที่ทำให้เกิดเจล

# Development of bacterial cellulose production in molasses by using coconut juice as the nutrient supplement and adding of gelling agent

**กาญจนา ชินสำราญ[1*] และ ฤทัยรัตน์ สุทธิสุวรรณ[1]**

Kanjana Chinsamran[1*] and Rutairat Suttisuwan[1]

**บทคัดย่อ**

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริมและเติมสารที่ทำให้เกิดเจล ได้แก่ อะการ์ เพคติน และอัลจิเนต ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สภาวะการหมักแบบนิ่ง ใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 หมักที่อุณหภูมิห้อง ผลการศึกษา พบว่า แบคทีเรียสร้างเซลลูโลสได้ดีที่สุดในกากน้ำตาลที่ละลายด้วยน้ำมะพร้าวที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เท่ากับ 10 ดีกรีบริกซ์ และเติมสารเพคตินร้อยละ 0.5 โดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 15 วัน สามารถขยายระดับการผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ได้เซลลูโลสจากแบคทีเรีย 710.38 กรัม/ลิตร (น้ำหนักเปียก/ปริมาตร) หรือ 28.05 กรัม/ลิตร (น้ำหนักแห้ง) คิดเป็นผลได้ร้อยละ 2.80 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าน้ำมะพร้าวและเพคติน สามารถนำมาใช้ในการส่งเสริมการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากน้ำตาลเป็นซับสเตรทได้

**คำสำคัญ**: เซลลูโลสจากแบคทีเรีย กากน้ำตาล น้ำมะพร้าว สารที่ทำให้เกิดเจล

**Abstract**

The objective of this study was to develop the bacterial cellulose production from the *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 in molasses medium by using coconut juice as the nutrient supplement and adding gelling agents which including agar, pectin and alginate at various concentration. The fermentation system was conducted in static culture using 10% inoculum and incubated at the room temperature. The result shows that the highest bacterial cellulose can be produced in molasses which dissolved in the coconut juice at 10 °brix of total solid, added 0.5% of pectin and spent 15 days of fermentation time. The scale of the fermentation at the 1 liter of medium has a 710.38 g/l (wet weight/volume) of cellulose or 28.05 g/l (dry weight), and the percent yield was 2.80. The result also suggests that coconut juice and pectin can be used in order to enhance bacterial cellulose production in medium with the use of molasses.

**Keywords**: bacterial cellulose, molasses, coconut juice, gelling agent

[1] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ กรุงเทพฯ 10120

[1] Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Krungthep, Bangkok 10120

* Corresponding author. E-mail: kanjana.c@rmutk.ac.th

## บทนำ

เซลลูโลสจากแบคทีเรียได้จากการหมักน้ำตาล น้ำผลไม้ หรือน้ำมะพร้าวด้วยแบคทีเรียในหลายจีนัส เช่น Acetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes ชนิดที่มีการศึกษากันมาก คือ *Acetobacter xylinum* โดยเส้นใยเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรีย มีโครงสร้างและคุณสมบัติเฉพาะที่แตกต่างจากเส้นใยเซลลูโลสจากพืช คือ มีลักษณะเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ ไม่มีเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเพคตินเจือปน และยังเป็นเส้นใยที่มีความเป็นไฮโดร-ฟิลิกสูง อุ้มน้ำได้ดีประมาณ 60-700 เท่าของน้ำหนักแห้ง ทนแรงดึงสูง แต่มีขนาดเล็กมาก หนาเพียง 3-4 นาโนเมตร กว้าง 60-80 นาโนเมตร และยาว 180-960 นาโนเมตร เส้นใยมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ สามารถควบคุมลักษณะทางกายภาพได้ตามต้องการ โดยการจัดองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงและสภาวะการหมัก ปัจจุบันมีการศึกษาถึงการนำเส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาแปรรูปและประยุกต์ใช้ประโยชน์ในทางอาหารและอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เช่น นำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพทั้งอาหารคาวและอาหารหวานชนิดต่างๆ เช่น นำมาผสมในเยลลี โยเกิร์ต ไอศกรีม และมีรายงานการประยุกต์ใช้ในงานอื่นๆ เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษที่ต้องการความเหนียวสูง ในอุตสาหกรรมเครื่องเสียง ใช้ทำกระดาษลำโพง ใช้ผลิตหูฟัง นอกจากนี้คุณสมบัติที่ไม่แนบติดอยู่กับบาดแผลและสามารถปรับเปลี่ยนรูปร่างได้ง่าย ทั้งยังมีลักษณะโปร่งใส ทำให้มีการทดลองใช้เซลลูโลสจากแบคทีเรียในทางการแพทย์มากขึ้น เช่น ใช้ในการตกแต่งบาดแผล ซ่อมแซมและทดแทนเนื้อเยื่อ ผิวหนังเทียม หลอดเลือดเทียม เป็นต้น (Jonas and Farah, 1998; Keshk *et al*., 2006; Cheng *et al*., 2009; Gu and Catchmark, 2012; Shah *et al*., 2013) ปัจจัยสำคัญในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยวัตถุดิบต่างๆ คือ ต้องมีการเติมน้ำตาลซูโครสลงไปเป็นส่วนผสมเพื่อให้แบคทีเรียใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญ ซึ่งในปัจจุบันสถานการณ์น้ำตาลซูโครสราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นการแสวงหาแหล่งวัตถุดิบใหม่ที่เป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรหรือผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำตาลซูโครสอยู่มากแต่ราคาถูกหรือหาได้ง่ายมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริมและการใช้เทคนิคใหม่ๆ ในการผลิต เช่น การเติมสารที่ทำให้เกิดเจล (gelling agent) เพื่อเพิ่มผลได้ จะทำให้สามารถขยายระดับการผลิตเข้าสู่อุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ

กากน้ำตาลหรือโมลาส (molasses) เป็นผลพลอยได้ (by product) จากการผลิตน้ำตาลในประเทศไทย มีปริมาณมากกว่า 4 แสนตัน/ปี ในปัจจุบันโมลาสได้ทวีบทบาทความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในภาคอุตสาหกรรมต่อเนื่องหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมผลิตผงชูรส อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เป็นต้น ลักษณะของโมลาสเป็นของเหลวเหนียวข้น สีน้ำตาลเข้ม โมลาสส่วนใหญ่มีความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 80 ดีกรีบริกซ์ ประกอบด้วย น้ำตาล-ซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ท และน้ำ ดังนั้นการนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียซึ่งสามารถทำการเจือจางได้หลายเท่า

เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* จึงเป็นการลดต้นทุนในการผลิตลงด้วย งานวิจัยนี้ทำการพัฒนากระบวนการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* โดยนำน้ำมะพร้าวมาใช้เป็นตัวทำละลายกากน้ำตาลเพื่อเพิ่มสารอาหารต่างๆ ซึ่งจะเป็นการส่งผลให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดีและผลิตเส้นใยเซลลูโลสได้ในปริมาณมาก เป็นการเพิ่มปริมาณผลผลิตได้อีกทางหนึ่งด้วย นอกจากจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตแล้วจะสามารถขยายระดับการผลิตในปริมาณมากเข้าสู่อุตสาหกรรมเพื่อการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งจะเป็นการเสริมสร้างรายได้ให้กับประชากรไทยและสร้างความเข้มแข็งทางเศรษฐกิจอีกทางหนึ่งด้วย

**วัตถุประสงค์ของงานวิจัย**

1. เพื่อศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลในการผลิตเส้นใยเซลลูโลสโดยเชื้อ *Acetobacter xylinum*

2. เพื่อศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของน้ำมะพร้าวที่นำมาทำละลายกากน้ำตาลในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

3. เพื่อศึกษาชนิดของสารที่ทำให้เกิดเจลและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากกากน้ำตาลที่มีน้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริม

4. เพื่อศึกษาศักยภาพในการขยายระดับการผลิตเส้นใยเซลลูโลสจากกากน้ำตาลที่มีน้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริมและเติมสารที่ทำให้เกิดเจล

## วิธีการศึกษา

**1. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย**

หัวเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

**2. การดำเนินการทดลอง**

**2.1 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น**

การเตรียมหัวเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 ทำได้โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดทดสอบ ทำการฆ่าเชื้อแล้วทิ้งให้เย็น จากนั้นจึงถ่ายเชื้อ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 ลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) 1-2 วัน จะเกิดเป็นแผ่นวุ้นขุ่น เป็นเยื่อบางๆ จากนั้นขยายปริมาณเชื้อในขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการศึกษาการผลิตเซลลูโลสต่อไป

**2.2 ศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลในการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975**

นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ 8, 10, 12 และ 14 ดีกรีบริกซ์ เติมแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ร้อยละ 0.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็น 4.5 ด้วยกรดอะซิติก ใส่ในขวดแก้วปริมาณ 200 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 ลงไป ร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) ปิดด้วยผ้าขาวบาง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

ในสภาวะนิ่ง (static culture) เก็บเกี่ยวแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการหมักไปวัดความหนาและชั่งน้ำหนักของแผ่นเซลลูโลส

**2.3 ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของน้ำมะพร้าวที่นำมาทำละลายกากน้ำตาลในการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975**

ทำการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของน้ำมะพร้าวที่นำมาใช้ทำละลายกากน้ำตาลที่มีค่าของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 เพื่อผลิตเส้นใยเซลลูโลสโดยการหมักแบบกะ (batch fermentation) วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.2

**2.4 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารทำให้เกิดเจลที่เหมาะสมในการผลิตเส้นใยเซลลูโลสจากกากน้ำตาลที่มีน้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริม**

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเซลลูโลสโดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากน้ำตาลที่ละลายด้วยน้ำมะพร้าวเป็นซับสเตรท เติมสารที่ทำให้เกิดเจลแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อะการ์ (agar) เพคติน (pectin) และ อัลจิเนต (alginate) โดยแปรผันความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดเป็นร้อยละ 0, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.5 เติมหัวเชื้อ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 ลงไปร้อยละ 10 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน หาร้อยละของผลได้ ของเซลลูโลสที่ผลิตได้

**2.5 ศึกษาศักยภาพในการขยายระดับการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยใช้กากน้ำตาลที่มีน้ำมะพร้าวเป็นตัวทำละลายและเติมสารที่ทำให้เกิดเจล**

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเซลลูโลสโดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากน้ำตาลที่ละลายด้วยน้ำมะพร้าวเป็นซับสเตรท เติมสารที่ทำให้เกิดเจลที่ความเข้มข้นเหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการฆ่าเชื้อ จากนั้นใส่ลงในภาชนะบรรจุขนาดใหญ่ เติมหัวเชื้อ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 ลงไปร้อยละ 10 ปิดด้วยผ้าขาวบาง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน หาร้อยละของผลได้ของเซลลูโลสที่ผลิตได้

**2.6 การเตรียมแผ่นเซลลูโลสให้บริสุทธิ์เพื่อหาน้ำหนักแห้ง**

นำแผ่นเซลลูโลสที่เก็บเกี่ยวได้มาต้มในสารละลาย 0.5 นอร์มอล (N) NaOH เวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างในน้ำสะอาด 3-4 ครั้ง จนค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำล้างมีค่าเป็นกลาง (pH 7) จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ในตู้อบลมร้อน (hot air oven) นำมาชั่งจนน้ำหนักคงที่

**2.7 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติ**

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design; CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผล โดยใช้โปรแกรมทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**3. สถานที่และช่วงเวลาการดำเนินการวิจัย**

ดำเนินการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ ในช่วงเวลาระหว่าง 1 ตุลาคม 2555 ถึง 30 กันยายน 2557

**ผลการศึกษาและอภิปรายผล**

ผลการศึกษาการพัฒนาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในกากน้ำตาลโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริมและการเติมสารที่ทำให้เกิดเจล ดังนี้

**1. การเตรียมกล้าเชื้อตั้งต้น *Acetobater aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975**

การเตรียมกล้าเชื้อตั้งต้น โดยการถ่ายโคโลนีของเชื้อ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 จากจานเพาะเชื้อลงหลอดทดลอง เมื่อเชื้อเจริญเกิดลักษณะเป็นแผ่นวุ้นจึงถ่ายเชื้อในของเหลวลงในขวดแก้วฝาเกลียวที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยน้ำมะพร้าวและยีสต์สกัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งทำการฆ่าเชื้อและทิ้งให้เย็นแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 วัน จะเกิดลักษณะเป็นแผ่นวุ้นบางๆ ที่ผิวหน้า นำไปใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการศึกษาการผลิตเซลลูโลสต่อไป

**2. ผลการศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลในการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975**

จากการศึกษาการนำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เป็น 8, 10, 12 และ 14 ดีกรีบริกซ์ เติมแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ร้อยละ 0.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 4.5 ด้วยกรดอะซิติก ใส่ในขวดแก้ว ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมหัวเชื้อ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 ลงไปร้อยละ 10 ปิดด้วยผ้าขาวบาง หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เก็บแผ่นวุ้นที่ได้จากการหมักไปวัดความหนาและน้ำหนักของแผ่นเซลลูโลส ผลการทดลองดังแสดงใน (Table 1) พบว่า เมื่อใช้กากน้ำตาลที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นมีค่าของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ 10 ดีกรีบริกซ์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 สามารถผลิตแผ่นเซลลูโลสที่ผิวหน้าได้ความหนาสูงสุด 1.47 เซนติเมตร โดยมีน้ำหนัก 80.72 กรัมต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร (น้ำหนักเปียก/ปริมาตร) ที่ระยะเวลา 10 วัน แต่เมื่อใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นน้อยกว่า (8 ดีกรีบริกซ์) หรือสูงขึ้น คือ 12 และ 14 ดีกรีบริกซ์ เป็นแหล่งคาร์บอนจะได้แผ่นเซลลูโลสน้อยลงตามลำดับ ลักษณะแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีสีน้ำตาลเข้มตามสีของโมลาส ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Dudman (1959) ที่รายงานว่า การผลิตเซลลูโลสของแบคทีเรียในสกุล Acetobacter จะลดลงเมื่อเซลล์หยุดการเจริญเติบโต แม้ว่าจะมีน้ำตาลมากเกินในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการผลิตเซลลูโลสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้น เมื่อพิจารณาจากผลที่ได้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นกากน้ำตาลที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่มีค่าของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 10 ดีกรีบริกซ์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาขั้นต่อไป ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนในการผลิตลง

**Table 1** Thickness and weight of the bacterial cellulose sheet produced from *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 by using molasses diluted with distilled water at various concentrations.

| concentration of molasses diluted with distilled water ($^{o}$brix) | thickness of bacterial cellulose sheet (cm)[1/] | weight of bacterial cellulose sheet (wet weight/volume) (g/media 200 ml)[1/] |
|---|---|---|
| 8 | 1.03[c] | 63.99[c] |
| 10 | 1.47[a] | 80.72[a] |
| 12 | 1.26[b] | 77.81[b] |
| 14 | 1.13[c] | 68.58[c] |

[1/] Each value represents the mean of three replicates, the values followed by the same letter in the same column which are not significantly different at $p \leq 0.05$.

**3. ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของน้ำมะพร้าวที่นำมาทำละลายกากน้ำตาลในการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975**

จากผลการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของน้ำมะพร้าวที่นำมาใช้ทำละลายกากน้ำตาลที่มีค่าของแข็งทั้งหมด ที่ละลายได้ที่เหมาะสมจากข้อ 2 คือ 10 ดีกรีบริกซ์ เปรียบเทียบกับการทำละลายด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นเดียวกัน ในการผลิตเส้นใยเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 ด้วยวิธีการหมักแบบกะ (batch fermentation) ในสภาวะนิ่งเช่นเดียวกับข้อ 2 โดยเพิ่มระยะเวลาหมักเป็น 15 วัน ผลการทดลองดังแสดงใน (Table 2) จากผลการทดลองที่ได้ จะเห็นได้ว่าน้ำมะพร้าวที่ใช้ในการละลายกากน้ำตาลช่วยส่งเสริมการสร้างแผ่นเซลลูโลสได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย อาจเป็นผลจากสารอาหารที่มีในน้ำมะพร้าวช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 ได้ดีกว่าการทำละลายด้วยน้ำกลั่นเนื่องจากในน้ำมะพร้าวมีสารอาหารและแร่ธาตุหลายชนิด

**Table 2** Thickness and weight of the bacterial cellulose sheet produced by *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 grown on 200 ml medium contained 10 °brix molasses diluted with coconut juice and distilled water.

| diluents | thickness of bacterial cellulose sheet (cm)[1/] | weight of bacterial cellulose sheet (wet weight/volume) (g)[1/] |
|---|---|---|
| coconut juice | 2.53[a] | 141.82[a] |
| distilled water | 2.16[b] | 131.50[b] |

[1/] Each value represents the mean of three replicates, the values followed by the same letter in the same column which are not significantly different at $p \leq 0.05$.

**4. ศึกษาชนิดของสารทำให้เกิดเจลและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากกากน้ำตาลที่มีน้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริม**

ผลการศึกษาการเติมสารที่ทำให้เกิดเจลได้แก่ อะการ์ (agar) เพคติน (pectin) และอัลจิเนต (alginate) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 ในสภาวะใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากน้ำตาลที่ละลายด้วยน้ำมะพร้าวเป็นสารตั้งต้น ความเข้มข้น 10 ดีกรีบริกซ์ ใช้หัวเชื้อร้อยละ 10 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ดังแสดงใน (Table 3)

จากผลการทดลอง พบว่า การใช้อะการ์ (agar) เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถส่งเสริมการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียได้ สอดคล้องกับรายงานของ Bae *et al*. (2004) ที่ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* BPR 2001 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ corn steep liquor-fructose medium โดยใช้ถังหมักขนาด 10 ลิตร เติมด้วยอะการ์ร้อยละ 0 ถึง 1.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่า ความเข้มข้นของอะการ์ที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือร้อยละ 0.4 แต่ในการทดลองนี้ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตของเซลลูโลสสูงสุดคือร้อยละ 0.1 และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ปริมาณหรือความหนาของแผ่นเซลลูโลสจะลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะเมื่ออุณหภูมิต่ำลง อะการ์ที่ถูกเจลาติไนซ์ จะจับกันเป็นลิ่มหรือเป็นก้อนวุ้นและตกตะกอนอยู่ก้นขวด จุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ส่วนเพคตินและอัลจิเนตจะช่วยส่งเสริมให้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวทำละลายกากน้ำตาลเพียงอย่างเดียว โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับอัลจิเนตและเพคติน คือ ร้อยละ 0.5 ดัง (Figure 1) โดยเพคตินให้ร้อยละของผลได้มากกว่าอัลจิเนตที่ความเข้มเข้นเท่ากันและเมื่อเพิ่มเวลาในการหมักนานขึ้นเป็น 30 วัน แบคทีเรียสามารถใช้กากน้ำตาลที่ละลายด้วยน้ำมะพร้าวและเติมเพคตินร้อยละ 0.5 เพื่อสร้างแผ่นเซลลูโลสได้เต็มพื้นที่ภาชนะบรรจุดัง (Figure 2) จากผลการทดลองที่ได้ในข้อ 4 จึงเลือกใช้เพคตินร้อยละ 0.5 ในการขยายระดับการผลิตเพิ่มขึ้นในการศึกษาขั้นต่อไป

**Table 3** Comparison of bacterial cellulose yields produced from *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 by using molasses diluted with coconut juice and adding different gelling agents at various concentrations.

| gelling agents | concentration of gelling agents (%) | % yield (g/100 ml)[1/] |
|---|---|---|
| control | 0 | 54.54[e] |
| agar | 0.1 | 76.29[b] |
| | 0.2 | 72.71[c] |
| | 0.4 | 65.52[d] |
| | 0.5 | 59.54[e] |
| pectin | 0.1 | 70.23[c] |
| | 0.2 | 74.64[c] |
| | 0.4 | 77.94[b] |
| | 0.5 | 87.12[a] |
| alginate | 0.1 | 70.56[c] |
| | 0.2 | 73.73[c] |
| | 0.4 | 76.05[b] |
| | 0.5 | 81.97[b] |

[1/] Each value represents the mean of three replicates, the values followed by the same letter within the same column are not significantly different at $p \leq 0.05$.

0.5% alginate 0.5% pectin

**Figure 1** The bacterial cellulose production in conditions which adding alginate and pectin 0.5%.

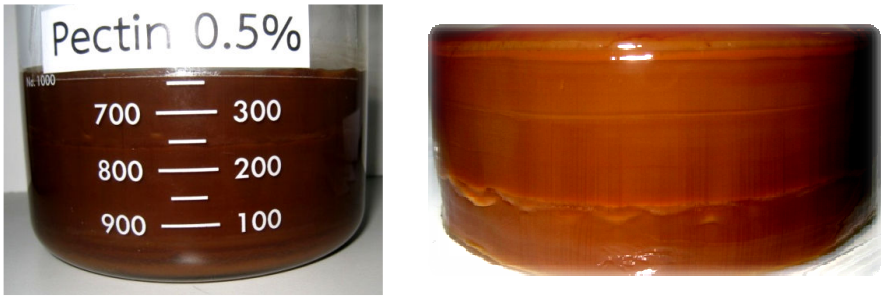


**Figure 2** The bacterial cellulose production in conditions which adding pectin 0.5% and bacterial cellulose sheet obtained after 30 days of cultivation.

**5. ศึกษาศักยภาพในการขยายระดับการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยใช้กากน้ำตาลละลายด้วยน้ำมะพร้าวและเติมสารที่ทำให้เกิดเจล**

ผลการศึกษาศักยภาพในการขยายระดับการผลิตเซลลูโลสโดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากน้ำตาลที่ละลายด้วยน้ำมะพร้าวเป็นสารตั้งต้นและเติมสารที่ทำให้เกิดเจลที่ความเข้มข้นเหมาะสมที่ได้จากผลการทดลอง ข้อ 4 คือ เพคติน ร้อยละ 0.5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในภาชนะบรรจุขนาดใหญ่ขึ้น 3 ชนิด คือ ขวดแก้ว บิกเกอร์ และกล่องสี่เหลี่ยม เติมหัวเชื้อ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 ลงไปร้อยละ 10 ปิดด้วยผ้าขาวบาง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ร้อยละผลได้ของเซลลูโลสที่ผลิตได้ดัง (Table 4) และการศึกษาศักยภาพในการขยายระดับการผลิตเซลลูโลสโดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากน้ำตาลที่ละลายด้วยน้ำมะพร้าวเป็นสารตั้งต้นและเติมเพคติน ร้อยละ 0.5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ลงในภาชนะบรรจุขนาด 15x22x8 เซนติเมตร (กว้างxยาวxลึก) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 ลงไป ร้อยละ 10 ปิดด้วยผ้าขาวบาง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน ร้อยละผลได้ของเซลลูโลสที่ผลิตได้ดัง (Table 5)

**Table 4** Yield of the bacterial cellulose produced from *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 by using 10 $^{o}$brix molasses diluted with coconut juice and adding pectin 0.5% in scale up 500 ml medium.

| culture container | weight of bacterial cellulose sheet (wet weight/volume) (g)[1/] | % yield |
|---|---|---|
| 1 L glass bottle | 390.48[a] | 78.10[a] |
| 1 L beaker | 387.73[a] | 77.55[a] |
| plastic tray size 11.5x17x6 cm | 369.63[b] | 73.93[b] |

[1/] Each value represents the mean of three replicates, the values followed by the same letter in the same column which are not significantly different at $p \leq 0.05$.

**Table 5** Yield of the bacterial cellulose produced from *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 by using 10 °brix molasses diluted with coconut juice and adding pectin 0.5% in scale up 1 L medium.

| condition of cultivation | wet weight of bacterial cellulose sheet (g)[1/] | dry weight of bacterial cellulose sheet (g)[1/] | % yield |
|---|---|---|---|
| control | 508.78 | 15.03[b] | 1.50[b] |
| adding pectin 0.5% | 710.38 | 28.05[a] | 2.80[a] |

[1/] Each value represents the mean of three replicates, the values followed by the same letter within the same column are not significantly different at $p \leq 0.05$.

จากผลการทดลองแสดงว่าเพคตินสามารถส่งเสริมการสร้างเซลลูโลสจากแบคทีเรียได้ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยของ Gu and Catchmark (2012) ซึ่งศึกษาผลกระทบของเฮมิเซลลูโลสและเพคตินต่อการรวมตัวของเซลลูโลสจากแบคทีเรียในรูปทรงกลม พบว่า ในสภาวะที่มีเพคตินร้อยละ 0.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการหมักด้วยเชื้อ *Gluconacetobacter xylinus* ภายใต้สภาวะการเขย่ามีผลได้ของเซลลูโลสเพิ่มขึ้น บ่งชี้ว่าเพคตินสามารถใช้ในการกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของเซลลูโลสได้ ซึ่งอาจเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาในการรวมตัวของเพคตินกับเซลลูโลส เช่นเดียวกับรายงานของ Chanliaud and Gidley (1999) ที่ศึกษาการรวมตัวกันของเซลลูโลสที่ผลิตได้จาก *Acetobacter xylinus* กับเพคติน อาจเกิดจากการจับตัวกันของเซลลูโลสกับโซ่ข้างที่เป็นน้ำตาลของเพคติน ในขณะที่ Kacura'kova' *et al*. (2002) รายงานการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสและเพคตินโดยเทคนิค FT-IR Spectroscopy ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของสารทั้งสอง

## สรุป

การศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยใช้กากน้ำตาล (โมลาส) เป็นซับสเตรทและใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวทำละลายในสภาวะการเติมสารให้เกิดเจลด้วยแบคทีเรีย *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 พบว่าแบคทีเรียนี้จะสร้างแผ่นเซลลูโลสได้ดีในกากน้ำตาลที่ละลายด้วยน้ำมะพร้าวที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เท่ากับ 10 ดีกรีบริกซ์ (10 °brix) และเติมสารเพคตินร้อยละ 0.5 โดยใช้หัวเชื้อร้อยละ 10 เวลาในการหมัก 15 วัน สามารถขยายระดับการผลิตในภาชนะพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาด 15x22x8 เซนติเมตร ในปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ได้แผ่นวุ้นที่มีความหนา 2.5 เซนติเมตร และน้ำหนักเปียก 710.38 กรัม (น้ำหนัก/ปริมาตร) น้ำหนักแห้ง 28.05 กรัม คิดเป็นผลได้ (% yield) ร้อยละ 2.80 ของน้ำหนักแห้ง จากผลการวิจัยพบว่า แผ่นวุ้นที่ได้มีสีน้ำตาลตามสีของโมลาส ดังนั้นการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ด้านอาหารอาจต้องมีการศึกษาถึงวิธีการทำให้สีจางลงโดยไม่เกิดอันตรายกับผู้บริโภค เพื่อการยอมรับมากขึ้น หรือมีการศึกษาสภาวะเหมาะสมอื่นๆ ในการพัฒนาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 975 เช่น ระยะเวลาที่เหมาะสม ชนิดของแหล่งไนโตรเจน การใช้โมลาสที่ไฮโดรไลซ์การผลิตเซลลูโลสในสภาวะการหมักแบบเขย่า ซึ่งอาจจะทำให้ได้ผลผลิตของเซลลูโลสมากขึ้น และควรมีการศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของแผ่นเซลลูโลสที่ผลิตได้

เพื่อวิจัยต่อยอดถึงความเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ต่อไป เช่น เส้นใยเสริมอาหาร กระดาษ ฟิล์มชีวภาพหรือผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์อื่นๆ เป็นต้น

## เอกสารอ้างอิง


Bae, S., Y. Sugano and M. Shoda. 2004. Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor. *J Biosci Bioeng*. *97*: 33-38.

Chanliaud, E. and M.J. Gidley. 1999. In vitro synthesis and properties of pectin/*Acetobacter xylinus* cellulose composites. *Plant J*. *20*: 25-35.

Cheng, K-C., J.M. Catchmark and A. Demirci. 2009. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *J Biol Eng*. *3*: 12.

Dudman, W.F. 1959. Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* and other *Acetobacter* spp. *J Gen Microbiol*. *21*: 312-326.

Gu, J. and J.M. Catchmark. 2012. Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly. *Carbohydr Polym*. *88*: 547-557.

Jonas, R. and L.F. Farah. 1998. Production and application of microbial cellulose. *Polym Degrad Stabil*. *59*: 101-106.

Kacura'kova', M., A.C. Smith, M.J. Gidley and R.H. Wilson. 2002. Molecular interaction in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. *Carbohydr Polym*. *337*: 1145-1153.

Keshk, S., T. Razak and K. Sameshima. 2006. Bacterial cellulose production from beet molasses. *Afr J Biotechnol*. *5*: 1519-1523.

Shah, N., M. Ul-Islam, W.A. Khsttak and J.K. Park. 2013. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. *Carbohydr Polym*. *98*: 1585-1598.