*บทความวิจัย*

# สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียจากน้ำเปลือกแตงโมโดยเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP 1

**ดวงใจ โอชัยกุล**[1*]

---

*ได้รับบทความ: 2 พฤษภาคม 2562*
*ได้รับบทความแก้ไข: 30 กันยายน 2562*
*ยอมรับตีพิมพ์: 24 ตุลาคม 2562*

## บทคัดย่อ

เซลลูโลสจากแบคทีเรียสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยใช้วัตถุดิบที่เป็นผลพลอยได้ทางการเกษตร งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะใช้เปลือกแตงโมซึ่งเป็นของเหลือทิ้งมาเป็นวัตถุดิบราคาถูกในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยใช้ *Komagataeibacter* sp. PAP1 และศึกษาคุณสมบัติของกระดาษที่ได้จากเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารน้ำเปลือกแตงโมและอาหารมาตรฐาน Hestrin-Schramm (HS medium) ผลการทดลองพบว่าน้ำเปลือกแตงโมสามารถนำมาใช้ผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียได้อย่างดี สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยใช้น้ำเปลือกแตงโมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการเติมน้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และปรับ pH เริ่มต้น 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน โดยให้ผลผลิตเซลลูโลส 6.20 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารมาตรฐาน HS 1.94 เท่า กระดาษที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำเปลือกแตงโมจะมีค่าความแข็งแรงสูงกว่ากระดาษที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารมาตรฐาน HS การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเปลือกแตงโมสามารถนำมาใช้ผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียได้และมีต้นทุนที่ถูกลง

**คำสำคัญ:** เซลลูโลสจากแบคทีเรีย เปลือกแตงโม *Komagataeibacter* sp.

---

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
[*]ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail ; daungjai.oc@kmitl.ac.th

# Optimization of Bacterial Cellulose Production from Watermelon Rind by *Komagataeibacter* sp. PAP1

**Duangjai Ochaikul**[1*]

*Received: 2 May 2019*
*Revised: 30 September 2019*
*Accepted: 24 October 2019*

## ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is produced by several microorganisms on agriculture by-products. This research aims to utilize waste watermelon rind as low cost substrates to produce BC using *Komagataei* bacter sp. PAP1 and to study the structural properties of BC papers in both watermelon rind and Hestrin-Schramm (HS) media. This result indicated that watermelon rind water performed well for BC production. The optimized watermelon water-based medium composed of 5% (w/v) mannitol, 0.1% (w/v) diammonium phosphate and pH 6.0 and incubated at 30°C for 7 days. Under these conditions, BC yield was 6.20 ± 0.25 g/L, 1.94 folds higher than that in standard Hestrin-Schramm (HS) medium. The BC paper sheets produced using the obtained BC pellicle from optimized watermelon rind water-base medium gave higher mechanical strength than those from standard HS medium. This study showed the possibility of using watermelon rind to produce BC and made BC production more cost-effective.

**Keywords:** Bacterial cellulose, Watermelon rind, *Komagataeibacter* sp.

[1]Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand
[*]Corresponding author email: daungjai.oc@kmitl.ac.th

## บทนำ

เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (Bacterial cellulose, BC) เป็นพอลิแซคคาไรด์ทางชีวภาพชนิดหนึ่ง ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Komagataeibacter* sp. (ชื่อเดิม *Gluconacetobacter*) [1], *Aerobacter, Agrobacterium, Rhizobium, Sarcina* และ *Pseudomonas* อย่างไรก็ตาม *Gluconacetobacter* เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสได้สูง และนิยมใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรม [2] การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะนิ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียจะสร้างแผ่นเซลลูโลสขึ้นที่ผิวหน้าอาหารหมัก [3] การสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรีย เริ่มจากกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate จนได้เป็น uridine diphosphate glucose (UDP-glucose) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิตเซลลูโลส [4] ปัจจุบันนี้มีความสนใจที่จะนำแผ่นเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากเซลลูโลสจากแบคทีเรียมีค่าความแข็งแรงดึงสูง มีความบริสุทธิ์สูง และความสามารถในการดูดซับน้ำสูง จากคุณสมบัติเหล่านี้จึงมีการนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาใช้เป็นวัสดุในการผลิตกระดาษที่มีคุณภาพสูง กระดาษลำโพง และอาหารลดน้ำหนัก [5-6] อย่างไรก็ตาม ต้นทุนในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียยังสูง ประสิทธิภาพในการผลิตค่อนข้างต่ำ และอาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาแพง มีความพยายามแก้ปัญหาเหล่านี้โดยนำของเหลือทิ้งจากการเกษตร และโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ผลิตเซลลูโลส ซึ่งจะลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่ง มีงานวิจัยต่างๆได้นำวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้มาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเซลลูโลสจากแบคทีเรีย เช่น น้ำทิ้งจากกระบวนการหมักพอลิแซคคาไรด์ประเภท Pullulan [7] น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตสุรากลั่น [8] และเปลือกส้มและกากส้ม [9] งานวิจัยนี้สนใจศึกษาเปลือกแตงโม ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากการบริโภคเนื้อแตงโม แตงโมมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Citrullus lanatus* อยู่ในวงศ์ *Cucurbitaceae* เป็นพืชที่ขึ้นได้ทั่วไปในเขตร้อนชื้น [10] เป็นผลไม้ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก มีหลายพันธุ์ เช่น พันธุ์จินตหรา ตอร์ปิโด เป็นต้น งานวิจัยส่วนใหญ่จะศึกษาคุณสมบัติของเนื้อแตงโม เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ [10] และคุณค่าทางอาหารต่างๆ ของแตงโม ยังไม่มีการศึกษาการนำเปลือกแตงโมซึ่งเป็นของเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์ งานวิจัยนี้จึงได้สนใจที่จะนำเปลือกแตงโมมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลส โดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียดังกล่าว เพื่อจะขยายกำลังการผลิตในอุตสาหกรรมต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีทดลอง

### 1. การเตรียมหัวเชื้อของ *Komagataeibacter* sp. PAP 1

เชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสได้สูง แยกได้จากมะละกอในประเทศไทย [11] เตรียมอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ซึ่งประกอบด้วยน้ำมะพร้าวแก่ 1 ลิตร น้ำตาลทรายร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และกรดอะซิติกร้อยละ 1.0 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเติมเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ลงในอาหาร บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน

**2. การเตรียมน้ำเปลือกแตงโม**

ซื้อแตงโมพันธุ์กินรีจากตลาดหัวตะเข้ กรุงเทพฯ ล้างน้ำให้สะอาด ผ่าแตงโมเป็นชิ้นๆ นำส่วนเปลือกที่เหลือจากการบริโภคหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1x1 เซนติเมตร และปั่นโดยใช้โถปั่นไฟฟ้า เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองเอาส่วนน้ำโดยใช้ผ้าขาวบาง นำส่วนน้ำเปลือกแตงโมวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและนำมาใช้เป็นอาหารหมัก

**3. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ในการศึกษานี้ ใช้อาหารหมัก 3 สูตร ดังนี้**

สูตรที่ 1 = น้ำเปลือกแตงโม

สูตรที่ 2 = น้ำเปลือกแตงโม น้ำตาลทรายร้อยละ 5 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 และกรดอะซิติกร้อยละ 1 ปรับ pH เท่ากับ 6.0 (น้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว)

สูตรที่ 3 = น้ำเปลือกแตงโม น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2 เปปโตนร้อยละ 0.5 ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.27 และกรดซิตริกร้อยละ 0.12 ปรับ pH เท่ากับ 6.0 (น้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตร HS)

นำอาหารทั้งสามสูตรบรรจุในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตรของอาหาร หมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน วิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลส ความหนาของแผ่นเซลลูโลสโดยใช้เวอร์เนีย pH ของน้ำหมักวัดด้วยเครื่องวัด pH

$$\text{ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งเซลลูโลส (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของอาหารหมัก (มิลลิลิตร)}} \times 1000$$

**4. การเก็บเกี่ยวแผ่นเซลลูโลสและการทำให้เซลลูโลสบริสุทธิ์**

นำแผ่นเซลลูโลสลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียออกจากแผ่นเซลลูโลส [12] ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายครั้งจนกระทั่งน้ำสุดท้ายมี pH เป็นกลาง นำแผ่นเซลลูโลสอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) คัดเลือกสูตรอาหารที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

**5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจาก *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ในสูตรอาหารที่คัดเลือก**

**5.1 แหล่งคาร์บอน**

โดยใช้แหล่งคาร์บอนดังนี้ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส แมนนิทอล และกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เติมในอาหารสูตรที่คัดเลือกได้ ปรับ pH เท่ากับ 6.0 บรรจุในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเติมหัวเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร หมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์ความหนาของแผ่นเซลลูโลส pH ของอาหารหมักและผลผลิตเซลลูโลส

**5.2 แหล่งไนโตรเจน**

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนดังนี้ แอมโมเนียมซัลเฟต ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต น้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor) และ ยีสต์สกัด (Yeast extract) ใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เติมในอาหารสูตรที่คัดเลือก โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 5.1 ทำการหมักและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับหัวข้อ 5.1

**5.3 พีเอชเริ่มต้นของอาหารหมัก**

แปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารสูตรที่คัดเลือกดังนี้ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 เติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้น ทำการหมักและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับหัวข้อ 5.1

**5.4 ความเข้มข้นของเอทานอล**

แปรผันความเข้มข้นของเอทานอลดังนี้ ร้อยละ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 โดยปริมาตร เติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน รวมทั้งพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมักที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้น เติมเอทานอลในอาหารสูตรที่คัดเลือก ทำการหมักและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับหัวข้อ 5.1

**6. เปรียบเทียบผลผลิตเซลลูโลสจากอาหารที่คัดเลือกกับอาหารสูตรมาตรฐาน HS medium**

เลี้ยง *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ในอาหารที่คัดเลือกได้ในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้นและเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรมาตรฐาน HS medium ซึ่งประกอบด้วย กลูโคสร้อยละ 2 ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 เปปโตนร้อยละ 0.5 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.27 กรดซิตริกร้อยละ 0.12 และ pH 6.0 บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติม *Komagataeibacter* sp. PAP 1 หมักที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน วิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลส วัดความหนาแผ่นเซลลูโลส และวัด pH ของอาหารหมัก

**7. การผลิตกระดาษจากเซลลูโลสที่ได้จากการหมัก**

เตรียมอาหารหมักสูตรที่คัดเลือกได้ และใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้น ฆ่าเชื้ออาหารโดยต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที แบ่งใส่ถาดหมักซึ่งมีขนาด 21x30x5 เซนติเมตร ปริมาตรอาหาร 700 มิลลิลิตร เติมเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร หมักเป็นเวลา 10 วัน เก็บแผ่นเซลลูโลสที่ได้ล้างน้ำให้สะอาด แช่ในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 0.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 คืน ล้างด้วยน้ำสะอาด ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดแอมโมเนียออก นำมาอัดรีดน้ำด้วยเครื่องอัดรีดน้ำ จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้แผ่นเซลลูโลสแห้ง นำแผ่นเซลลูโลสแห้งต้มด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อฟอกสีแผ่นเซลลูโลสให้ขาว ล้างด้วยน้ำสะอาด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และผลิตกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรมาตรฐาน HS medium เปรียบเทียบผลกับกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากอาหารหมักที่คัดเลือกได้

**7.1 ศึกษาสมบัติเชิงกลของกระดาษเซลลูโลสที่ได้จาก *Komagataeibacter* sp. PAP 1**

นำกระดาษเซลลูโลสที่ได้ทดสอบคุณสมบัติเชิงกล เช่น ความแข็งแรงดึง (Tensile strength) ค่ายืด ณ จุดขาด (Elongation at break) และค่ามอดูลัสของยังส์ (Young's modulus) โดยใช้เครื่องมือ Universal Testing Machine

**7.2 ศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส**

นำกระดาษที่ได้จากการศึกษาข้างต้นส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) เพื่อดูการจัดเรียงตัวของเส้นใย

**8. การวิเคราะห์ทางสถิติ**

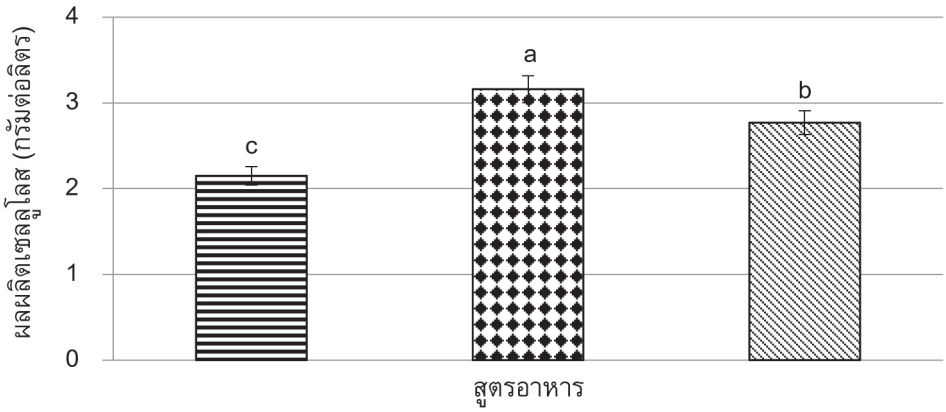
วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) มีจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) สำหรับการศึกษาในหัวข้อการเปรียบเทียบผลผลิตเซลลูโลสจากอาหารที่คัดเลือกกับอาหารสูตรมาตรฐาน HS ซึ่งมี 2 ชุดการทดลอง วิเคราะห์โดยใช้ T-test (Independent t-test) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล

## ผลการทดลอง

**1. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสโดย *Komagataeibacter* sp. PAP 1**

จากการทดลองพบว่า สูตรที่ 2 ซึ่งเป็นน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว จะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด คือ $3.16 \pm 0.12$ กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งเป็นน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหาร HS medium จะให้ผลผลิตเซลลูโลส $2.77 \pm 0.45$ กรัมต่อลิตร สำหรับสูตรที่ 1 ซึ่งเป็นน้ำเปลือกแตงโมอย่างเดียว เชื้อสามารถเจริญและผลิตเซลลูโลสได้ แต่มีปริมาณน้อย แสดงดังรูปที่ 1 อาจเนื่องจากในเปลือกแตงโมมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 น้อย ซึ่งจากการวิเคราะห์สารอาหารในน้ำเปลือกแตงโมพบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเตรตร้อยละ 2.31 น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.70 และน้ำตาลฟรุคโตสร้อยละ 1.19 ไม่พบน้ำตาลซูโครส และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.12

ดังนั้นจึงได้คัดเลือกอาหารหมักสูตรที่ 2 ซึ่งเป็นน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าวมาใช้ศึกษาต่อไป

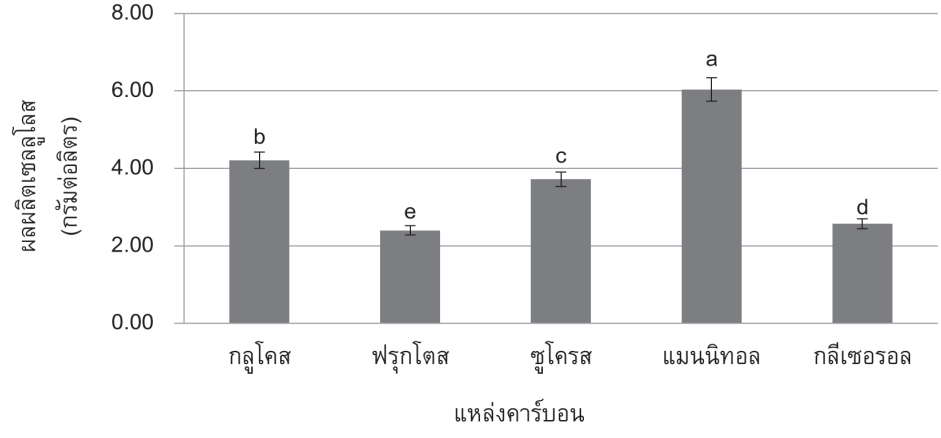



**รูปที่ 1** ผลผลิตเซลลูโลสจากการเลี้ยง *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ในอาหารทั้งสามสูตร : ▤ น้ำเปลือกแตงโม ▦ น้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว และ ▨ น้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตร HS ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

## 2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสโดย *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ในอาหารสูตรที่คัดเลือก

### 2.1 แหล่งคาร์บอน

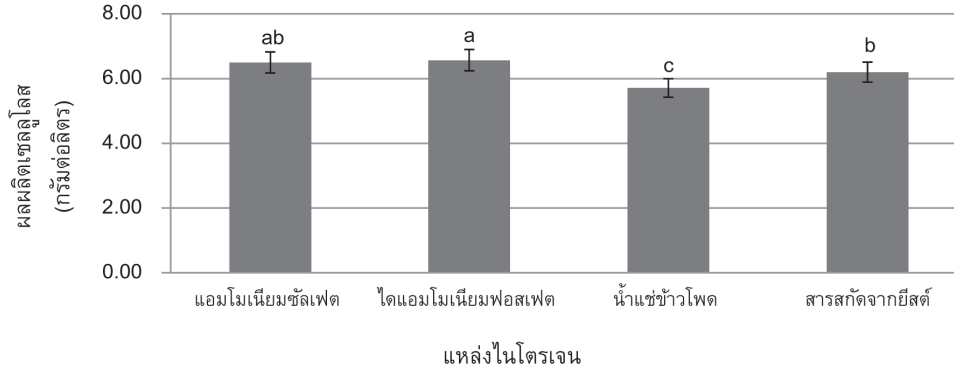
จากการนำอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งเป็นน้ำเปลือกแตงโมเติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว และใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่าการใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด เท่ากับ 6.04 ± 0.28 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือน้ำตาลกลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล และฟรุกโตส ซึ่งให้ผลผลิตเซลลูโลส 4.21 ± 0.03, 3.72 ± 0.07, 2.57 ± 0.04 และ 2.40 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 2




**รูปที่ 2** ผลผลิตเซลลูโลสได้จากการเลี้ยง *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน หมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

**2.2 แหล่งไนโตรเจน**

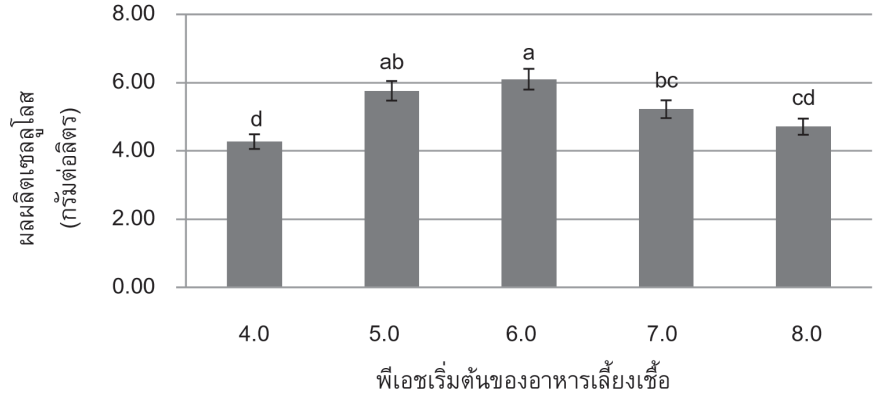
จากการใช้อาหารสูตรที่ 2 ซึ่งเป็นน้ำเปลือกแตงโมเติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว และใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) และยีสต์สกัด (yeast extract) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) หมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน พบว่าไดแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตร-เจนที่ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดคือ 6.57 ± 0.09 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็น แอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด และน้ำแช่ข้าวโพด ซึ่งให้ผลผลิต 6.50 ± 0.22 6.20 ± 0.25 และ 5.71 ± 0.07 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 3




**รูปที่ 3** ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยง *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน หมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

**2.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมัก**

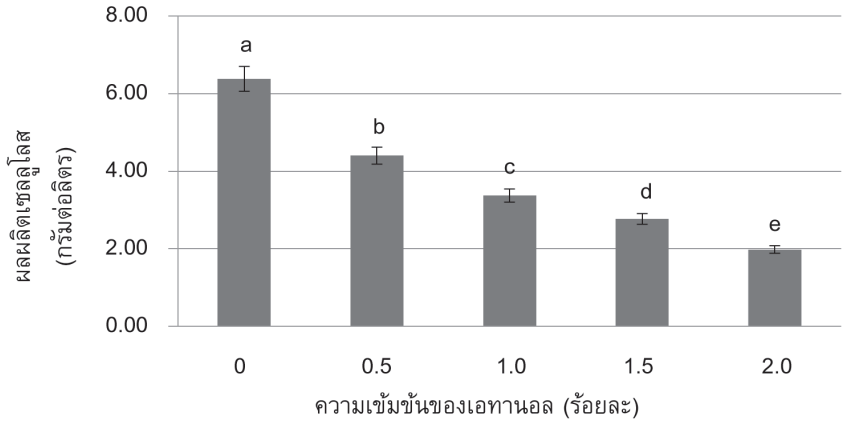
การปรับ pH เริ่มต้นของอาหารหมักเท่ากับ 6.0 จะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด เท่ากับ 6.10 ± 0.17 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ pH 5.0 ซึ่งให้ผลผลตเซลลูโลส 5.76 ± 0.56 กรัมต่อลิตร และผลผลิตเซลลูโลสไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ pH 6.0 แสดงดังรูปที่ 4




**รูปที่ 4** ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยง *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ในอาหารที่มี pH เริ่มต้นแตกต่างกัน หมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

**2.4 ผลของการเติมเอทานอล**

จากการศึกษาพบว่า อาหารหมักที่ไม่เติมเอทานอล (ร้อยละ 0 โดยปริมาตร) จะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงเท่ากับ 6.24 ± 0.18 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมเอทานอล ผลผลิตเซลลูโลสจะลดลงซึ่งการเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 2.0 มีผลผลิตเซลลูโลสต่ำสุดเท่ากับ 1.98 ± 0.06 กรัมต่อลิตร แสดงดังรูปที่ 5




**รูปที่ 5** ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการเติมเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารหมักของ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 หมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

**3. เปรียบเทียบการผลิตเซลลูโลสในอาหารที่คัดเลือกได้กับอาหารสูตรมาตรฐาน HS medium**

จากการทดลองพบว่า อาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมที่ใช้น้ำตาลแมนนิทอล และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 สามารถให้ผลผลิตเซลลูโลส 6.20 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าในอาหารสูตรมาตรฐาน HS medium (3.20 ± 0.24 กรัมต่อลิตร) แสดงดังตารางที่ 1

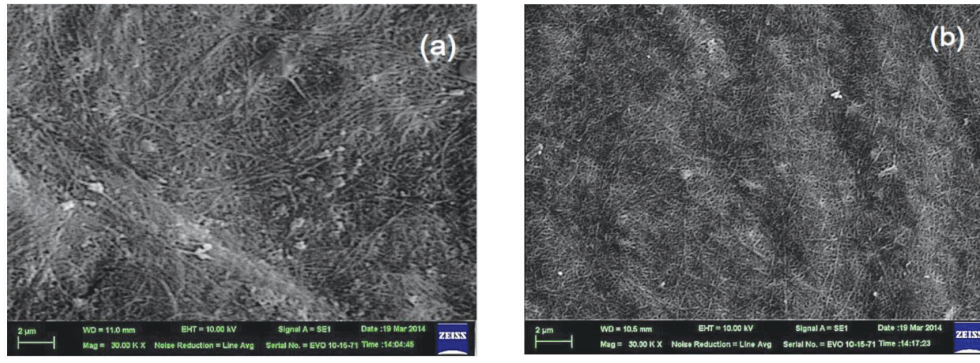
**ตารางที่ 1** pH ของอาหารหมัก ความหนา และผลผลิตเซลลูโลสจากการเลี้ยง *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ในอาหารที่แตกต่างกัน หมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

| สูตรอาหาร | pH น้ำหมัก (มิลลิเมตร) | ความหนา (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตเซลลูโลส |
|---|---|---|---|
| สูตรอาหารมาตรฐาน HS | $5.82^{a} \pm 0.04$ | $5.96^{b} \pm 0.64$ | $3.20^{b} \pm 0.24$ |
| สูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสม | $4.87^{b} \pm 0.045$ | $8.83^{a} \pm 0.06$ | $6.20^{a} \pm 0.25$ |

ตัวอักษรต่างกันในแถวแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

**4. ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสและคุณสมบัติเชิงกลของกระดาษเซลลูโลส**

ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่ากระดาษที่ผลิตจากอาหารสูตรน้ำเปลือกแตงโมและอาหารสูตรมาตรฐาน HS medium มีเส้นใยขนาดเล็กมาก และเชื่อมกันเป็นร่างแหอย่างหนาแน่น และโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสไม่แตกต่างกัน แสดงดังรูปที่ 6 สำหรับคุณสมบัติเชิงกลของกระดาษที่ได้ พบว่ากระดาษที่ได้จากสูตรน้ำเปลือกแตงโมมีค่าความแข็งแรงดึง และค่ามอดูลัสของยังส์สูงกว่ากระดาษที่ได้จากสูตรมาตรฐาน HS medium แสดงดังตารางที่ 2




**รูปที่ 6** ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในสูตรอาหารน้ำเปลือกแตงโมในสภาวะที่เหมาะสม (a) และอาหารมาตรฐาน HS (b) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 30,000 เท่า

**ตารางที่ 2** ค่าความแข็งแรงดึง ค่ามอดูลัสของยังส์ และค่ายืด ณ จุดขาดของกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในอาหารสูตรที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสมและอาหารมาตรฐาน HS

| ชนิดของกระดาษ | ค่าความแข็งแรงดึง (นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร) | ค่าการยืด ณ จุดขาด (ร้อยละ) | ค่ามอดูลัสของยังส์ (นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร) |
|---|---|---|---|
| กระดาษจากสูตรอาหารมาตรฐาน HS | 36.64 ± 2.32 | 2.55 ± 0.89 | 812.60 ± 3.70 |
| กระดาษจากสูตรอาหารที่คัดเลือกหมักในสภาวะที่เหมาะสม | 98.79 ± 3.11 | 7.87 ± 1.32 | 1,519.00 ± 10.05 |

## สรุปผลและวิจารณ์การทดลอง

เชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 เป็นเชื้อที่แยกได้จากมะละกอที่เน่าเสียในประเทศไทย [11] และมีความสามารถในการผลิตเซลลูโลสได้สูง ในงานวิจัยนี้ได้นำเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 มาใช้ผลิตเซลลูโลสจากเปลือกแตงโม ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการบริโภค จากการศึกษานำเปลือกแตงโมมาคั้นน้ำ และนำส่วนน้ำเปลือกแตงโมมาใช้เป็นอาหารหมักเพื่อผลิตเซลลูโลสจากเชื้อชนิดนี้ ในการทดลองแบ่งอาหารเป็น 3 สูตร สูตรที่ 1 เป็นน้ำเปลือกแตงโมอย่างเดียว สูตรที่ 2 เป็นน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ใช้ผลิตเซลลูโลสทางการค้า (น้ำเปลือกแตงโมเติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5 น้ำหนักต่อปริมาตร แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 น้ำหนักต่อปริมาตร และกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตร) สูตรที่ 3 เป็นน้ำเปลือกแตงโมที่เติมส่วนประกอบของอาหารมาตรฐาน HS medium ซึ่งเป็นสูตรมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูโลส จากการทดลองพบว่า สูตรที่ 1 ซึ่งเป็นน้ำเปลือกแตงโมอย่างเดียว *Komagataeibacter* sp. PAP 1 สามารถผลิตเซลลูโลสได้ต่ำกว่าสูตรที่ 2 และ 3 อาจเนื่องจากน้ำเปลือกแตงโมมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ต่ำ ซึ่งจากการวิเคราะห์ส่วนประกอบในน้ำเปลือกแตงโมพบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 2.31 น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.70 และน้ำตาลฟรุคโตสร้อยละ 1.19 ไม่พบน้ำตาลซูโครส และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.12 ซึ่งไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ขณะที่อาหารสูตรที่ 2 ซึ่งนำน้ำเปลือกแตงโมเติมน้ำตาลทราย แอมโมเนียมซัลเฟต และกรดอะซิติก เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และปรับ pH ของอาหารหมักให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อทำให้เชื้อสามารถเจริญและผลิตเซลลูโลสได้สูงสุด

จากนั้นได้คัดเลือกอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งเป็นน้ำเปลือกแตงโมที่เติมอาหารสูตรน้ำมะพร้าวมาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสต่อไป จากการนำอาหารสูตร 2 เติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน พบว่าการเติมน้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าน้ำตาลกลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล และฟรุคโตส ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Raghunathan [13] จึงได้คัดเลือกการใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาต่อไป จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจน พบว่าการใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตจะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด รองลงมาเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด และน้ำแช่ข้าวโพด ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Lapuz และคณะ [14] และการปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 จะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าการปรับ pH เริ่มต้นเป็น 5.0 และ 4.0 ทั้งนี้เนื่องจาก pH เริ่มต้นเป็น 6.0 เป็น pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสสำหรับเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 และการปรับ pH เท่ากับ 4.0 อาจทำให้มีการผลิตกรดกลูโคนิกสูง มีผลทำให้การผลิตเซลลูโลสลดต่ำลง [15] จากการศึกษาการเติมเอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารหมัก พบว่า การไม่เติมเอทานอล (ร้อยละ 0 โดยปริมาตร) ทำให้เชื้อผลิตเซลลูโลสสูงกว่าการเติมเอทานอลในความเข้มข้นต่าง ๆ อาจเนื่องมาจากการเติมเอทานอลมีผลทำให้ปริมาณอะซิเตทในอาหารเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ปริมาณเซลล์ในระยะ Stationary phase ลดลง ส่งผลให้การผลิตเซลลูโลสลดลงตามไปด้วย [16]

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ในน้ำเปลือกแตงโม พบว่าการนำน้ำเปลือกแตงโมเติมน้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารหมัก

เป็น 6.0 และไม่เติมเอทานอล จะให้ผลผลิตเซลลูโลส 6.20 ± 0.25 กรัมต่อลิตร เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐาน HS medium ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลลูโลส พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Komagataeibacter* sp. PAP 1 ในอาหารน้ำเปลือกแตงโมในสภาวะเหมาะสมที่ได้จากการศึกษาให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐาน HS medium สอดคล้องกับการทดลองของ Fan และคณะ [11] ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียจากกากส้มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยเชื้อ *Komagataeibacter xylinus* CICC No 10529 พบว่าให้ผลผลิตเซลลูโลส 5.7 ± 0.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารมาตรฐาน HS ซึ่งให้ผลผลิตเซลลูโลส 3.9 ± 0.6 กรัมต่อลิตร

การผลิตกระดาษจากเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารน้ำเปลือกแตงโมในสภาวะที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับกระดาษจากเซลลูโลสที่ได้จากอาหารสูตรมาตรฐาน HS medium พบว่าลักษณะเส้นใยเป็นร่างแหประสานกันแน่นไม่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบสมบัติเชิงกลของกระดาษ พบว่ากระดาษที่ได้จากอาหารน้ำเปลือกแตงโมมีค่าความแข็งแรงดึงและค่ามอดูลัสยังส์สูงกว่ากระดาษที่ได้จากอาหารสูตรมาตรฐาน HS medium

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2561

## เอกสารอ้างอิง

1. Delmer, D. P., & Amor, Y. (1995). Cellulose biosynthesis. *The Plant Cell, 7,* 987-1000.
2. Ross, P., Mager, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 55,* 35-58.
3. Son, H. J., Kim, H. G., Kim, K. K., Kim, H. S., Kim, Y. G., & Lee, S. J. (2003). Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. *Bioresource Technology, 86*(3), 215-219.
4. Ross, P., Mayer, R., Weinhouse, H., Amikam, D., Huggirat, Y., Benziman, M., de Vroom, E., Fidder, A., de Paus, P., Sliedregt, L. A., van der Marel, G. A., & van Boom, J. H. (1990). The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinus. Journal of Biological Chemistry, 265,* 18933-18943.
5. Ross, P., Mager, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 55,* 35-58.
6. Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science, 35*(2), 261-270.

7. Zhao, H., Xia, J., Wang, J., Yan, X., Wang, C., Lei, T., Xian, M., & Zhang, H. (2018). Production of bacterial cellulose using polysaccharide fermentation wastewater as inexpensive nutrient sources. *Biotechnology and Biotechnological Equipment, 32*(2), 350-356.
8. Wu, J. M., & Lui, R.H. (2013). Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 115*(3), 284-290.
9. Fan, X., Gao, Y., He, W., Hu, H., Tian, M., Wang, K., & Pan, S. (2016). Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste of citrus peel and pomace using *Komagataeibacter xylinus. Carbohydrate Polymers, 151,* 1068-1072.
10. Oseni, O. A., & Okoye, V. I. (2013). Studies of phytochemical and anti-oxidant properties of the fruit of watermelon *(Citrullis lanatus). Journal of Pharmaceutical and biomedical Science, 27*(27), 508-514.
11. Suwanposri, A., Yamada, Y., Yukaphan, P., & Ochaikul, D. (2013). Identification and biocellulose production of Gluconacetobacter strains isolated from tropical fruits in Thailand. *Maejo International Journal of Science and Technology, 7*(1), 70-82.
12. Bae, S., Sugano, Y., & Shoda, M. (2004). Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor. *Journal Bioscience Bioengineering, 97*(1), 33-38.
13. Raghunathan, D. (2013). Production of microbial cellulose from the new bacterial strain isolated from temple wash water. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science, 2*(12), 275-290.
14. Lapuz, M. M., Gallardo, E. G., & Palo, M. A. (1967). The nata organism-cultural requirement, characteristics and identify, Philippine. *Journal of Science, 96,* 91-109.
15. Hwang, J. K., Yang, Y. K., Pyun, Y. R., & Kim, Y. S. (1999). Effect of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRCS in agitated culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 88*(2), 183-188.
16. Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1998). Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering, 85*(6), 598-603.