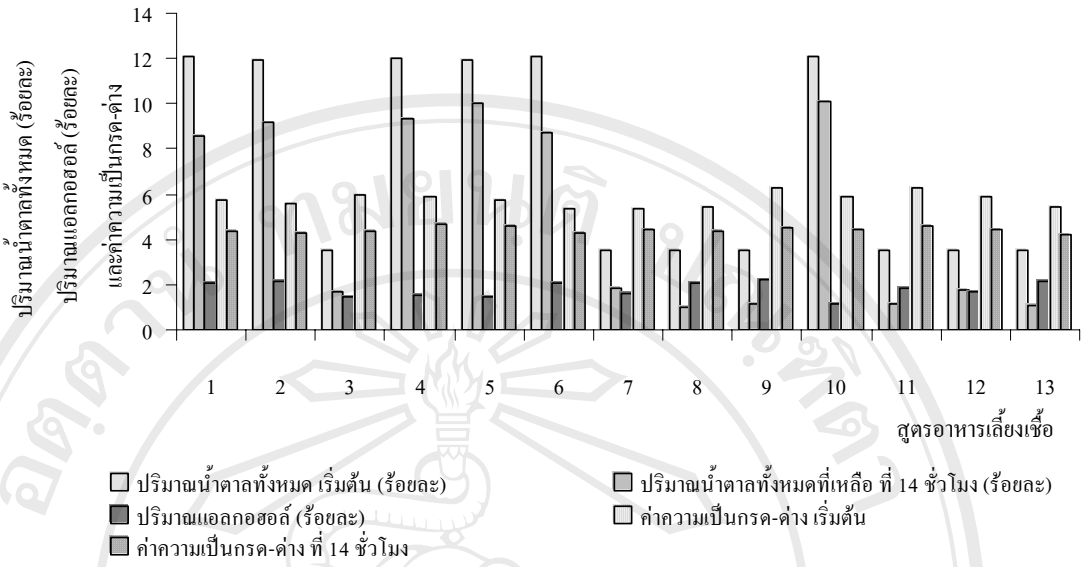
# ภาคผนวก ก

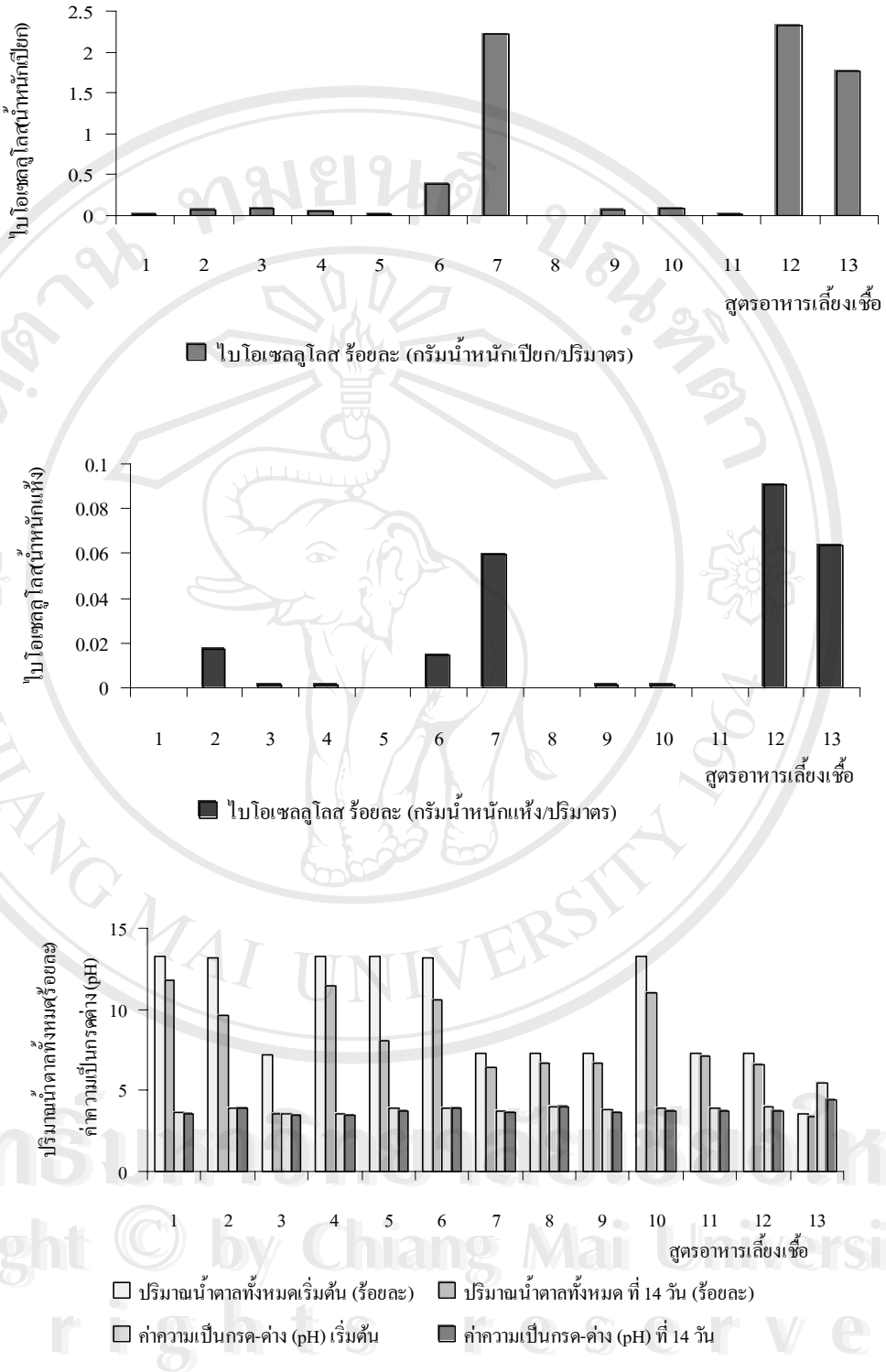
## ภาพจากผลการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



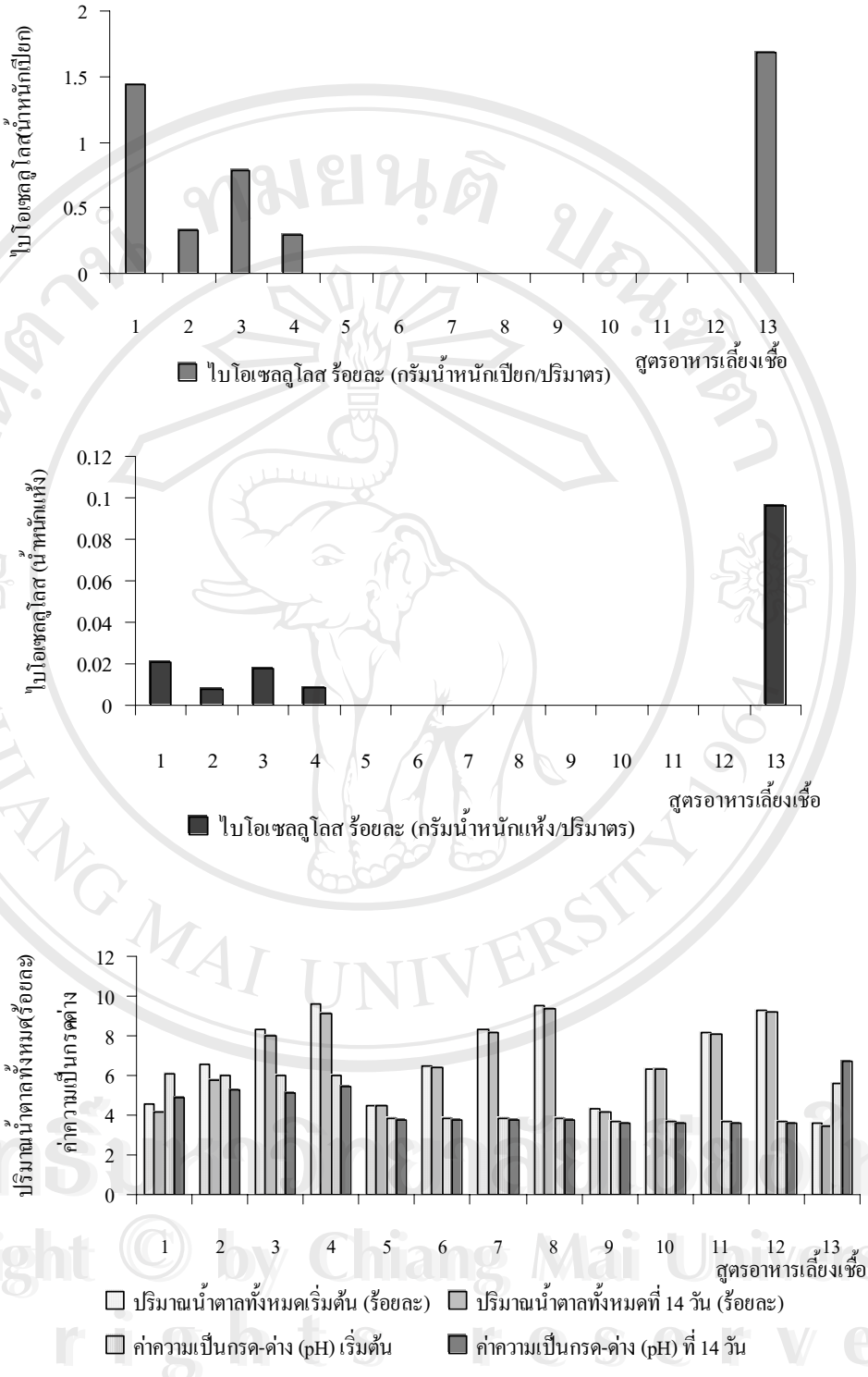

**ภาพที่ ก-1** ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณแอลกอฮอล์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อ *K. fragilis* TISIR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากการกลั่นกรองชนิดและปริมาณสารอาหารที่เติมในระดับสูง-ต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



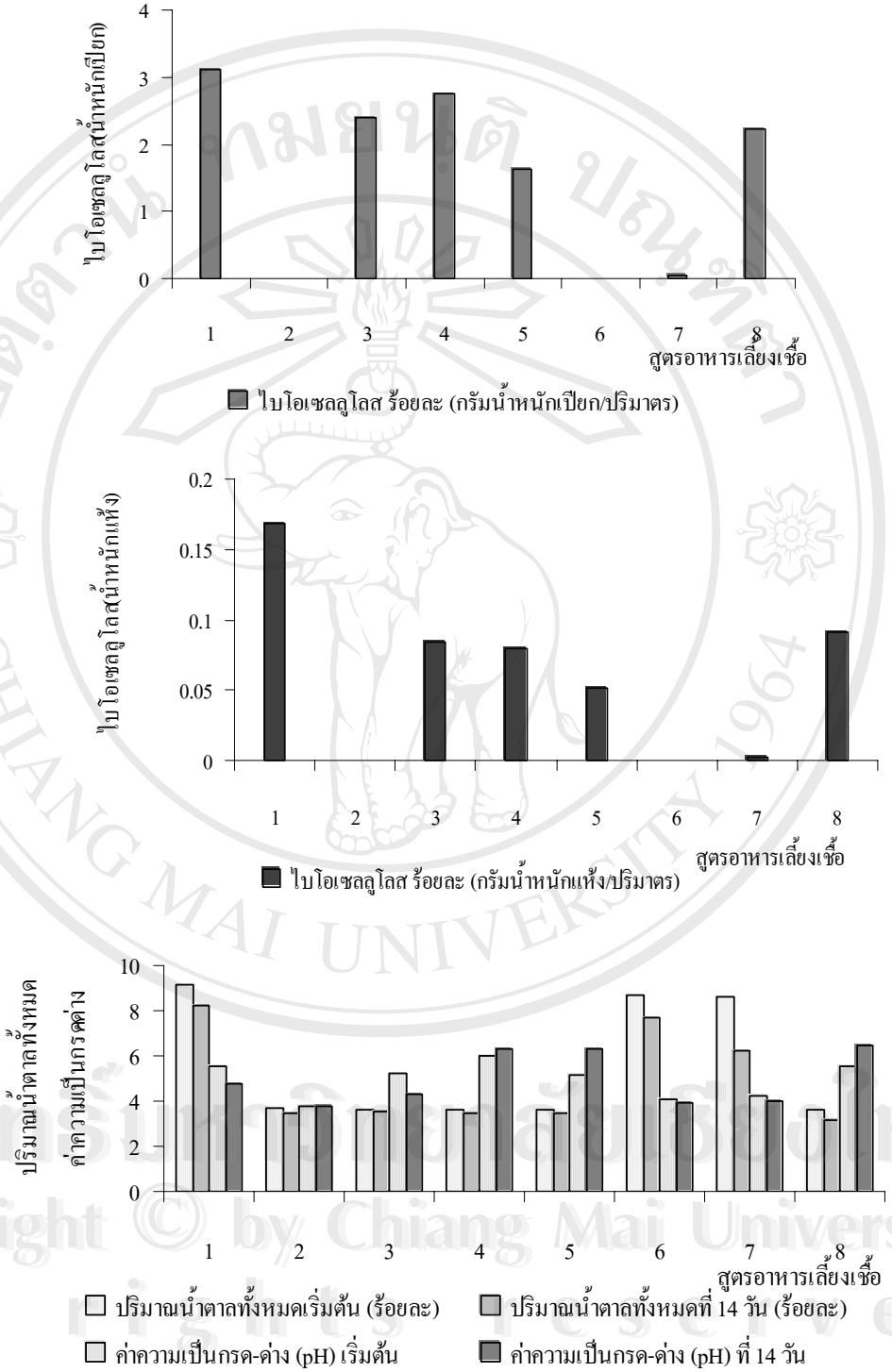

**ภาพที่ ก-2** ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของ *A. xylinum* TISTR 107 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อกลั่นกรองชนิดและปริมาณสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



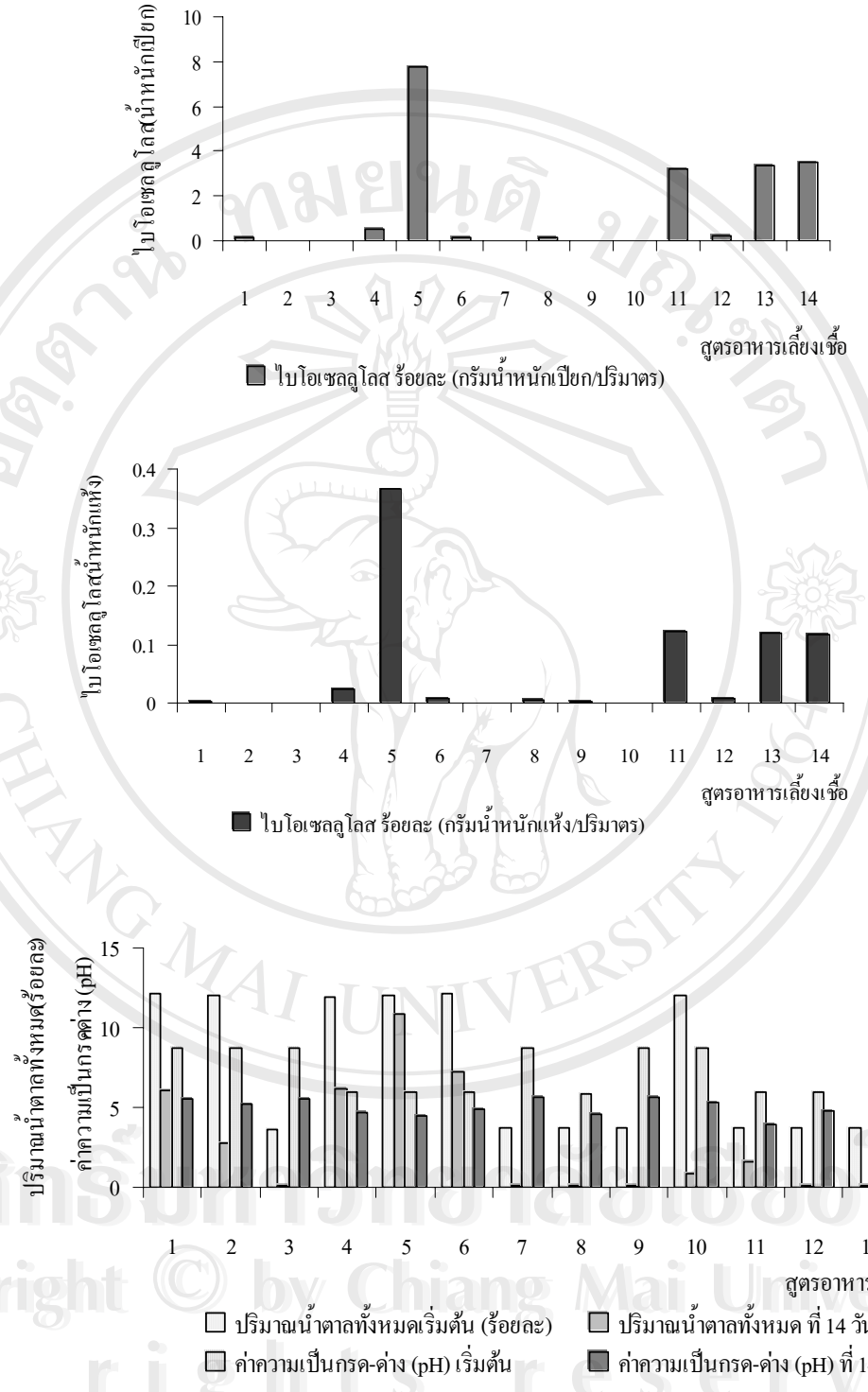

**ภาพที่ ก-3** ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเลี้ยง *A. xylinum* TISTR 107 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังทำการกลั่นกรองสารอาหาร ได้ปัจจัยหลักเป็นน้ำตาลซูโครส และ กรดอะซิติก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



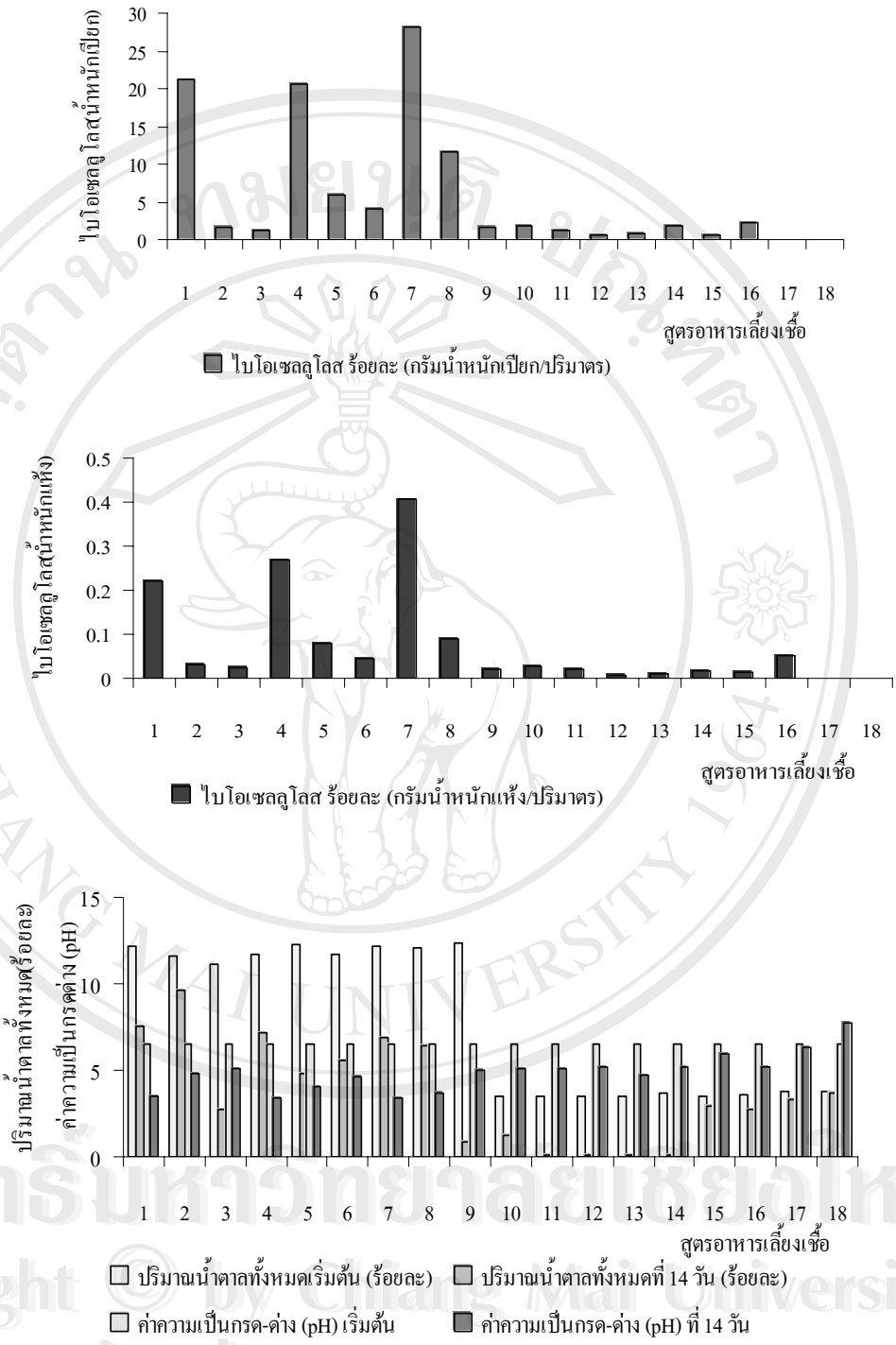

**ภาพที่ ก-4** ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่างจากการเจริญของ *A. xylinum* TISTR 107 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาผลของสารอาหารที่เติม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved




**ภาพที่ ก-5** ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญเพื่อสร้างไบโอเซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อเจริญร่วมกับเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการกลั่นกรองสารอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



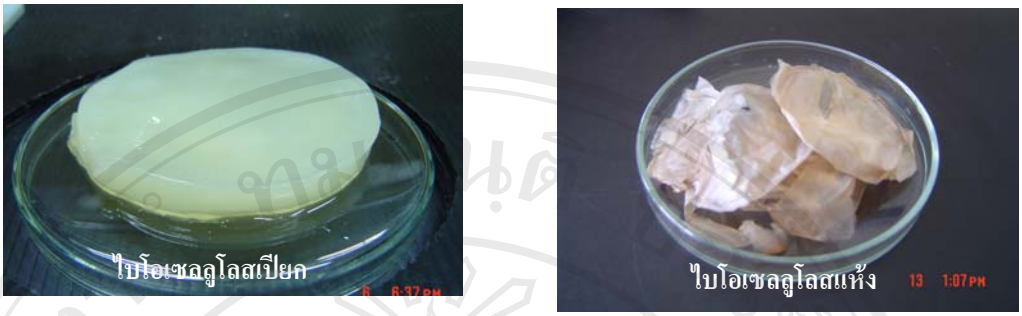

**ภาพที่ ก-6** ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็น กรด- ด่างจากการเจริญร่วมกันของเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR107 และ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษาผลของปัจจัยหลักคือ กล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ $(NH_4)_2HPO_4$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

# ภาคผนวก ข

## ภาพประกอบงานวิจัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

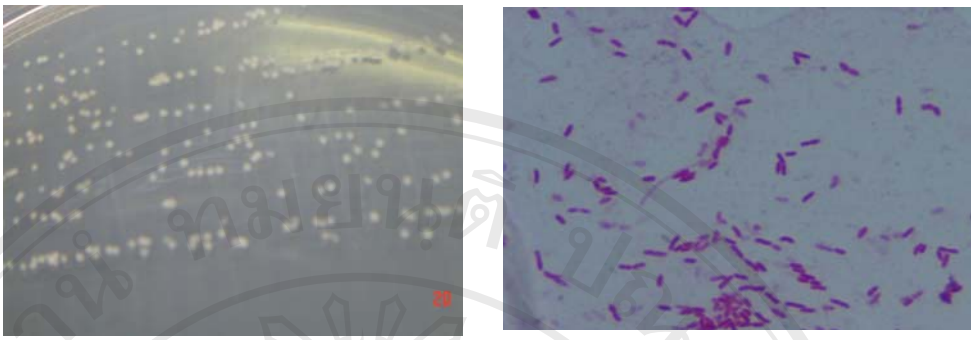



**ภาพ ข-1** ลักษณะไบโอเซลลูโลสเปียก และลักษณะไบโอเซลลูโลสแห้ง

**ภาพ ข-2** ลักษณะการเจริญของไบโอเซลลูโลสที่เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ (ซ้าย) และอุปกรณ์ที่ใช้เตรียมกล้าเชื้อ *A. xylinum* เริ่มต้น (ขวา)

**ภาพ ข-3** เครื่องเขย่าที่ใช้ในการทดลองดัดแปลงให้ควบคุมอุณหภูมิอยู่ในช่วง 30 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



**ภาพ ข-4** โคโลนีเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 107 ที่เจริญใน HSA และลักษณะติดสีแกรม

**ภาพ ข-5** โคโลนีเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* TISTR 107 ที่เจริญใน YMA และลักษณะการติดสีแกรม

**ภาพ ข-6** โคโลนีเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 107 และ *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* TISTR 107 ที่เจริญใน HSA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

# ภาคผนวก ค

## การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**1. การวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)**

**หลักการ**

เป็นการหาน้ำหนักที่เหลืออยู่หลังจากการระเหยน้ำและสารที่ระเหยได้ออกไปจากผลิตภัณฑ์แล้วภายใต้อุณหภูมิที่กำหนด

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

1. ถ้วยอลูมิเนียมหาความชื้นมีฝาปิด (moisture can)
2. เดซิกเคเตอร์ (desicator) ที่มีสารดูดความชื้น
3. เครื่องชั่งไฟฟ้า ชั่งน้ำหนักได้ละเอียด 0.1 มิลลิกรัม
4. ตู้อบไฟฟ้าควบคุมอุณหภูมิได้

**วิธีการวิเคราะห์**

1. อบ moisture can พร้อมฝาปิดในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 100±2°ซ นาน 30 นาที ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก (W1)
2. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน (2-3 กรัม) ใส่ใน moisture can ที่อบและชั่งน้ำหนักไว้แล้ว (W2)
3. นำ moisture can ที่ใส่ตัวอย่างแล้วไปอบในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 100±2°ซ โดยเปิดฝาออก อบเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง
4. นำออกจากตู้อบโดยปิดฝาทันทีและทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักไว้
5. นำเข้าอบต่ออีกครั้งละ 1 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ (W3) (น้ำหนักคงที่ หมายความว่าผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม)
6. บันทึกข้อมูลและผลการคำนวณลงในแบบบันทึกผลการวิเคราะห์หาของแข็งทั้งหมดดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณของแข็งทั้งหมด ร้อยละของน้ำหนัก = $\frac{(W3 - W1) \times 100}{W2 - W1}$

เมื่อ

W1 = น้ำหนักของ moisture can (กรัม)

W2 = น้ำหนักของ moisture can และตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W3 = น้ำหนักของ moisture can และตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

**2. การวิเคราะห์โปรตีน/ไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl Method; AOAC, 2000)**

โปรตีนเป็นสารประกอบไนโตรเจน คำนวณได้จากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดคูณกับแฟคเตอร์ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร

**หลักการ**

ตัวอย่างจะถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคโดยใช้คอปเปอร์ซัลเฟตและโพแทสเซียมซัลเฟตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและเพิ่มอุณหภูมิ ไนโตรเจนจะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียและทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริคได้แอมโมเนียมซัลเฟต ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะระเหยออกไป ดังสมการ

**สารประกอบไนโตรเจน** + $H_2SO_4$ ⟶ $CO_2$ + $H_2O$ + $(NH_4)_2SO_4$ + $SO_2$

เมื่อเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ซึ่งเป็นด่างแก่ลงไปในแอมโมเนียซัลเฟตและให้ความร้อน แอมโมเนียจะถูกปล่อยออกมาและจะถูกจับในสารละลายกรดบอริค

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \longrightarrow 2NH_3\uparrow + Na_2SO_4 + H_2O$$

$$NH_3 + H_3BO_3 \longrightarrow H_3BO_3NH_3$$

นำสารละลายที่กลั่นได้ไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริคเพื่อคำนวณปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ส่วนปริมาณโปรตีนคำนวณจากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดคูณกับแฟคเตอร์ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

1. เจลดาห์ลฟลาส (Kjeldahl flask) ขนาด 300-500 มิลลิลิตร
2. ชุดกลั่นโปรตีน (Kjeldahl distillation set)
3. ชุดย่อย (Kjeldahl digestion set)
4. ตู้ดูดควัน
5. บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร
6. สคูป หรือ ถ้วยอลูมิเนียมมีฝาปิด (moisture can)
7. กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร

**สารเคมี**

1. กรดซัลฟูริค ความเข้มข้นร้อยละ 98 (w/v)
2. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ปราศจากไนโตรเจน
3. โพแทสเซียมซัลเฟต ปราศจากไนโตรเจน
4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 (w/v)
5. สารละลายมาตรฐานซัลฟูริค ความเข้มข้น 1 นอร์แมล มีอายุการเก็บรักษา 1 เดือน หากครบกำหนดเวลาแล้วยังมีสารละลายมาตรฐานนี้เหลือมากพอสำหรับการใช้งาน ให้ทำการหาความเข้มข้นใหม่ (re-standardize) หรือนำไปใช้งานอื่นที่ไม่ต้องการทราบค่าความเข้มข้นแน่นอน
6. อินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator) ประกอบด้วยสารละลายเมทิลเรด (methyl red) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (w/v) ในแอลกอฮอล์ผสมกับสารละลายโบรโมครีซอลกรีน (bromocresol green) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (w/v) ในแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:5
7. สารละลายกรดบอริค ความเข้มข้นร้อยละ 4 (w/v)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**วิธีการวิเคราะห์**

1. ชั่งตัวอย่างนำหนักแน่นอนโดยใช้สคูปใส่ตัวอย่าง 0.5-2.0 กรัม และชั่งน้ำหนัก (W1) ถ่ายตัวอย่างลงในฟลาสเจลดาห์ล แล้วชั่งน้ำหนักสคูปที่ถ่ายตัวอย่างออกแล้ว (W2)
2. เติมคอปเปอร์ซัลเฟต จำนวน 0.5 กรัม และโพแทสเซียมซัลเฟต จำนวน 15 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 25 มิลลิลิตร โดยเอียงขวดและค่อยๆ รินกรดลงด้านข้างโดยรอบ เพื่อให้กรดชะล้างตัวอย่างที่อาจติดอยู่ด้านข้างลงไปให้หมด เขย่าเบาๆ ปิดปากฟลาส
4. นำไปย่อยในตู้ดูดควัน ปรับความร้อนให้อยู่ที่ระดับ 4 นาน 15 นาที แล้วเพิ่มความร้อนเป็นระดับ 5 ย่อยนาน 1 ชั่วโมง แล้วเพิ่มความร้อนขึ้นอีกครั้งโดยปรับความร้อนที่ระดับ 9 ย่อยต่ออีก 2 ชั่วโมง ปิดไฟ ตั้งไว้ให้เย็นจะได้สารละลายใสสีเขียว
5. นำฟลาสเจลดาห์ลที่ย่อยเรียบร้อยแล้วในข้อ 4 ไปกลั่นต่อใน Kjeldahl distillation set โดยปลายอีกด้านหนึ่งจะเป็นสารละลายบอริค 50 มิลลิลิตรที่เติมสารละลายอินดิเคเตอร์ผสม 6-10 หยด (เพื่อดักจับแอมโมเนียที่ได้จากการกลั่น)
6. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้มีปริมาณมากเกินพอผ่านทางท่อของ Kjeldahl distillation set กลั่นแอมโมเนียจนสารละลายบอริคเปลี่ยนเป็นสีฟ้าอมเขียว
7. นำสารละลายที่กลั่นได้ในข้อ 6 ไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริคจนได้จุดยุติคือสังเกตเห็นสีชมพูปรากฏขึ้นและสารละลายมีสีเทาอมม่วง
8. ทำ Blank เช่นเดียวกับตัวอย่าง
9. ให้บันทึกข้อมูล การคำนวณ และผลการคำนวณ ในแบบบันทึกผลการวิเคราะห์โปรตีน/ไนโตรเจนทั้งหมด
10. วิธีคำนวณปริมาณโปรตีน ทำได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน ร้อยละของน้ำหนัก} = \frac{[(Vs-Vb) \times N_{H2SO4} \times 1.4007]}{(W1 - W2)}$$

เมื่อ

Vs = ปริมาณของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริคที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่างเป็นมิลลิลิตร

Vb = ปริมาณของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริคที่ใช้ในการไตเตรท blank เป็นมิลลิลิตร

$N_{H2SO4}$ = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริค เป็นนอร์แมล

W1 = น้ำหนักสคูปและตัวอย่าง เป็นกรัม

W2 = น้ำหนักสคูปที่ถ่ายตัวอย่างออกแล้ว เป็นกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**ปริมาณโปรตีน ร้อยละของน้ำหนัก** = ปริมาณไนโตรเจน ร้อยละของน้ำหนัก ×แฟคเตอร์

หมายเหตุ: น้ำนมมีค่าแฟคเตอร์เป็น 6.38

**3. ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Ebulliometer (Dujardin-Salleron, Paris)** (นัยทัศน์, 2540)

*หาจุดเดือดของน้ำกลั่น*

เติมน้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตร โดยตวงในกระบอกตวงตามขีดที่กำหนด ลงในคอลัมน์เสียบด้วยเทอร์โมมิเตอร์ เติมน้ำประปาในลงในส่วนของเครื่องควบแน่น (condenser) ต้มน้ำในคอลัมน์ด้วยตะเกียงจำเพาะที่ได้มาตรฐานของเครื่อง เมื่อน้ำเดือดแล้วให้อ่านค่าอุณหภูมิคงที่ ค่าที่อ่านได้นำไปปรับแผ่นสไลด์โดยให้ขีดศูนย์ของเสกลนอกตรงกับขีดอุณหภูมิที่เป็นจุดเดือดของน้ำในแผ่นสเกลใน

*หาจุดเดือดของสารตัวอย่าง*

วิธีการทำเหมือนกับการหาจุดเดือดของน้ำกลั่น แต่เปลี่ยนน้ำกลั่นเป็นสารตัวอย่าง เมื่อตัวอย่างเดือดจนอุณหภูมิคงที่ อ่านค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์จากสเกลนอกที่ตรงกับขีดจุดเดือดของสารตัวอย่างสเกลใน โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ

**4. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและน้ำตาลทั้งหมดใช้วิธีของ Lane and Eynon** (AOAC, 2000)

**สารเคมีและวิธีการเตรียมสาร**

ก) สารละลาย Carrez No.1 เตรียมโดยละลายซิงอะซีเตต ไดไฮเดรต (Merck, Germany) จำนวน 21.9 กรัม ในน้ำกลั่นที่มีกรดอะซีติก (Merck, Germany) จำนวน 3 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ข) สารละลาย Carrez No.2 เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ (Merck, Germany) จำนวน 10.6 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ค) สารละลาย Fehling No.1 เตรียมโดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (Merck, Germany) จำนวน 69.278 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ง) สารละลาย Fehling No.2 เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 100 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

และโพแทสเซียมโซเดียมตาเตรต (Merck, Germany) จำนวน 346 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

จ) สารละลายเมทิลีนบูล ความเข้มข้นร้อยละ 1 เตรียมโดยละลายเมทิลีนบูล (Merck, Germany) จำนวน 1 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ฉ) สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล เตรียมโดยตวงสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Merck, Germany) จำนวน 564.33 มิลลิลิตร ค่อยๆ รินกรดลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

ช) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 นอร์มัล เตรียมโดยละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ (Merck, Germany) จำนวน 200 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกไป และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

**วิธีการวิเคราะห์**

ชั่งตัวอย่างน้ำเวย์ประมาณ 13 กรัม เติม clearing agent คือ สารละลาย Carrez No.1 and No. 2 ลงไป อย่างละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ("Whatman" เบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร) เก็บสารละลายที่กรองได้ไว้ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ดังต่อไปนี้

*การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงก่อนการทำอินเวอร์ชัน*

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย Fehling No.1 และ No.2 อย่างละ 5 มิลลิลิตรใส่ในฟลาส์คขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปตั้งบนเครื่อง Hot plate and magnetic stirrer จนเดือด หยดสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 1-2 หยด ไตเตรทกับสารละลายน้ำตาลตัวอย่างจนสีน้ำเงินจางลง ไตเตรทต่อจนสีฟ้าหายไปหมด เหลือตะกอนสีส้มแดง บันทึกปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ถ้าปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้อยู่ในช่วง 15-50 มิลลิลิตร แสดงว่าสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นเหมาะสม ทำการไตเตรทสารละลายตัวอย่างให้ได้ค่าที่ถูกต้องกับสารละลาย Fehling โดยปล่อยสารละลายน้ำตาลจากบิวเรตลงไปทันที โดยใช้ปริมาตรน้อยกว่าที่ใช้ในการไตเตรทครั้งแรกประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ปล่อยให้เดือดนาน 2 นาที หยดสารละลายเมทิลีนบลู 1 หยดไตเตรทจนสีฟ้าหายไปหมดเหลือตะกอนสีส้มแดง บันทึกปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำปริมาตรสารละลายน้ำตาลที่ใช้มาหาค่าเฉลี่ยแล้วนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลในสารละลายตัวอย่างจากตารางมาตรฐาน

*การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงภายหลังการทำอินเวอร์ชัน*

ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 50 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์คขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล ลงไป 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปไฮโดรไลซ์ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath "Gallenkamp", England) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็น แล้วปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายตัวอย่างนี้ใส่ลงในบิวเรต ทำการไตเตรทกับสารละลาย Fehling เช่นเดียวกับการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงก่อนการทำอินเวอร์ชัน

น้ำตาลซูโครส (%) = $(D_2 - D_1) \times 0.95$

น้ำตาลทั้งหมด (%) = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลซูโครส + $D_1$

เมื่อ $D_1$ = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลก่อนการทำอินเวอร์ชัน

$D_2$ = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลภายหลังการทำอินเวอร์ชัน

**5. วิเคราะห์ปริมาณไบโอเซลลูโลส** (Krusong et al., 2004)

**สารเคมีที่ใช้และวิธีการเตรียมสาร (น้ำหนักแห้ง)**

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, Germany) จำนวน 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกโดยต้มให้เดือดก่อนใช้ (ต้มนาน 20 นาที) และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**วิธีการวิเคราะห์**

แยกไบโอเซลลูโลสจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ล้างด้วยน้ำให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มัล ล้างด้วยน้ำแช่น้ำทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงล้างด้วยน้ำ ชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักเปียก/ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากนั้นนำไบโอเซลลูโลสไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักแห้ง/ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)

**6. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)** (AOAC, 2000)

ตัวอย่างเวย์ที่ผ่านการหมักที่เวลา 14 วัน วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้ เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Consort, Model C 830, Belgium) ซึ่งได้มีการปรับค่ามาตรฐานด้วยสารละลายมาตรฐานที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.00 และ 7.00 (Merk,Germany) นำ probe จุ่มลงในตัวอย่างเวย์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ทำการวัด 2 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

**7. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด (Total titrable acidity) (AOAC, 2000)**

**สารเคมีที่ใช้และวิธีการเตรียมสาร**

ก) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, Germany) มาจำนวน 4 กรัม ใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance, Sartorius analytic : Model A Germany) ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดและปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายด่างที่ได้ไปเปรียบเทียบความเข้มข้นกับสารละลายมาตรฐาน Potassium hydrogen phthalate (Merck, Germany) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายด่าง

ข) สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เตรียมโดย ชั่งฟีนอล์ทาลีน ( Merck, Germany) จำนวน 1 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ (Merck, Germany) จำนวน 60 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**วิธีการวิเคราะห์**

1. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างมา 1 กรัมหรือ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร

2. หยดสารละลายฟีนอฟธาลีน ประมาณ 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์

3. นำไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนสังเกตเห็นจุดยุติเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกดังนี้

การคำนวณปริมาณกรด (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH x ปริมาตร NaOH ที่ใช้ (ml) x กรัมสมมูลของกรดอะซิติก x 100}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (ml) x 100}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

# ภาคผนวก ง

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## และวิธีการปรับปริมาตร Adjustable air-displacement pipette

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Histrin and Schramm Broth (HS broth)** (Yang et al., 1998)

| | |
|---|---|
| Glucose | 20 กรัม |
| Yeast extract | 5 กรัม |
| Peptone | 5 กรัม |
| $Na_2HPO_4$ | 2.7 กรัม |
| Citric acid | 1.15 กรัม |

ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีใช้ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0

**2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Histrin and Schramm Agar (HS Agar)**

เตรียมเช่นเดียวกับ HS-broth แต่เติมผงวุ้น 20 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ใช้ HCl ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0

**3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Malt Extrac Broth (YMB)** (TISTR, 1995)

| | |
|---|---|
| Yeast Extract | 3.0 กรัม |
| Malt Extract | 3.0 กรัม |
| Peptone | 5.0 กรัม |
| Glucose | 10 กรัม |

ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นนึ่ง ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ใช้ HCl ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Malt Extrac Agar (YMA)**

เตรียมเช่นเดียวกับ YMB แต่เติมผงวุ้น 15 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ใช้ HCl ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0

**5. การเตรียม Maximum discovery diluent**

| | |
|---|---|
| NaCl | 8.5 กรัม |
| Peptone | 1 กรัม |

ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**วิธีการปรับปริมาตร Adjustable air-displacement pipette**

วิธีการปรับปริมาตร Adjustable air-displacement pipette (pipetteman) ทำดังนี้

1. นำ pipettman ปรับเสกลให้เท่ากับปริมาตรที่ต้องการใช้จริง
2. นำบีกเกอร์เปล่าวางและทำการปรับศูนย์บนเครื่องชั่ง
3. นำ pipettman ดูดน้ำกลั่น จากนั้นนำน้ำกลั่นไปชั่งน้ำหนัก โดยปล่อยน้ำกลั่นลงบนบีกเกอร์ที่ผ่านการปรับศูนย์อยู่บนเครื่องชั่ง โดยการดูดน้ำกลั่นในแต่ละครั้งต้องเปลี่ยน pipet-tip ใหม่ทุกครั้ง
4. ทำการปรับเสกล pipettman ดูดน้ำกลั่นชั่งน้ำหนักจนกระทั่งได้น้ำหนักน้ำกลั่นเท่ากับปริมาตรที่ต้องการใช้จริง เช่น ต้องการดูดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้องทำการปรับเสกล pipettman จนกระทั่งดูดน้ำกลั่นได้เท่ากับ 1 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

# ภาคผนวก จ

## การคำนวณทางสถิติ และตัวอย่างการแปรผลการทดลองทางด้านจุลินทรีย์ โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**การใช้รีเกรสชันเชิงเส้นหลายตัวแปรสำหรับการวิเคราะห์ผล Fractional Factorial ที่มีแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman**

การใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman นั้นใช้สำหรับการศึกษาเพื่อคัดเลือกกลั่นกรองปัจจัย (screening) กล่าวคือ จากแผนการทดลองทำให้สามารถวิเคราะห์ถึงปัจจัยที่มีผลกระทบหลัก (Main effect) เท่านั้น แต่ไม่สามารถศึกษาถึงผลของ Interaction ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในการทดลองได้ สำหรับชุดทดลอง (experiment) นั้น มีอนุกรมเป็นจำนวนเท่าของ 4 (4N) เช่น 4, 8, 12, 16 และ 20 เป็นต้นโดยการทดลองที่มี ตัวแปรหรือปัจจัยที่ต้องการศึกษา (N) ต่าง ๆ มี Initial block แตกต่างกัน การใช้ Initial block โดยกำหนดชุดทดลองแรก (Initial block) จากนั้นชุดทดลองต่อไปกำหนดในลักษณะโครงสร้างวน (Cyclic Construction) คือนำรหัสที่ตัวที่สองของ Initial block ขึ้นมาเป็นรหัสตัวแรกของชุดทดลองถัดไปแล้ววนให้ครบ N-1 รอบ โดยชุดทดลองสุดท้าย (ชุดทดลองที่12) กำหนดรหัสในแต่ละปัจจัยเป็นระดับต่ำ (-) อย่างไรก็ตามการเลือกจำนวน N สำหรับการทดลองใด ๆ ขึ้นอยู่กับจำนวนตัวแปรและปัจจัยที่ศึกษา เช่น หากมีตัวแปรหรือปัจจัยที่สนใจศึกษาจำนวน 9 ปัจจัย จำนวน N ที่เหมาะสมคือ 12 หากปัจจัยที่ศึกษามี 7 ปัจจัย จะไม่สามารถใช้ N = 8 ได้ เพราะ degree of freedom ของปัจจัยจะเป็น 7 และรวมกับ intercept อีก 1 จะเป็น 8 เนื่องจากไม่มี degree of freedom เหลือเพื่อใช้ทดสอบความแปรปรวนจึงต้องใช้ชุดทดลองจำนวน 9 เป็นอย่างน้อย ดังนั้น จำเป็นต้องเลือก N ถัดไปเท่ากับ 12 หรือมากกว่าแทน (อิศรพงษ์, 2545)

**การวิเคราะห์ทางสถิติ**

ค่าเฉลี่ยคุณภาพแต่ละลักษณะในชุดทดลองจะนำมาหาผล (Effect) ของตัวแปร หรือปัจจัยทดลองที่มีต่อลักษณะนั้น ๆ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ผลของตัวแปร หรือ ปัจจัย} = \frac{\text{ผลตอบสนองเมื่อใช้ที่ระดับสูง}}{\text{จำนวนสิ่งทดลองที่ใช้ระดับสูง}} - \frac{\text{ผลตอบสนองเมื่อใช้ที่ระดับต่ำ}}{\text{จำนวนสิ่งทดลองที่ใช้ระดับต่ำ}}$$

ผลของ Dummy (Effect of Dummy) จะถูกนำมารวมกันเพื่อประมาณค่าความแปรปรวนของผลจากปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

$$\text{ความแปรปรวน (Varience of effect)} = \frac{(\text{ผลรวมของ Dummy})^2}{\text{จำนวนของ Dummy}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังนั้น ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานจากผลของ Dummy คำนวณได้ดังนี้

ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน = (ความแปรปรวน)$^{1/2}$

ความแตกต่างทางสถิติของแต่ละปัจจัยสามารถคำนวณได้โดยใช้ t-test

$$\text{t-value} = \frac{\text{ผลของปัจจัยแต่ละปัจจัย}}{\text{ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน}}$$

การทดสอบความแตกต่างทางสถิติทำได้โดยนำค่า t-value ที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบกับตารางค่า t-test ที่มีค่า Degree of freedom เท่ากับจำนวนของ Dummy ในการทดลอง และมีระดับความเชื่อมั่นของการทดสอบคือร้อยละ 85 หรือ $p \leq 0.15$ เหตุที่ใช้ระดับความเชื่อมั่นต่ำก็เพื่อลดการมองข้ามปัจจัยที่น่าจะมีความสำคัญด้วย (ไพโรจน์, 2539) จากการวิเคราะห์เครื่องหมายของค่าสัมประสิทธิ์ หรือค่า Student's t บอกให้ทราบว่าปัจจัยดังกล่าว ส่งอิทธิพลแบบแปรตาม (เป็นบวก) หรือแปรผกผัน (เป็นลบ) กับตอบสนอง (response variable) ที่ได้จากการทดลอง การที่มีอิทธิพลแบบแปรตาม แสดงว่า หากใช้ปัจจัยนั้นเพิ่มขึ้น ย่อมทำให้ค่าสังเกตเพิ่มขึ้นด้วย หากส่งอิทธิพลแบบแปรผกผัน แสดงว่า การใช้ปัจจัยนั้น ๆ เพิ่มขึ้น ย่อมทำให้ค่าสังเกตที่ได้ลดลง การเลือกปัจจัยที่นำไปศึกษาต่อควรจะพิจารณาถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัยหรือทดลองเป็นสำคัญ (อิศรพงษ์, 2545)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**ผลของสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์ต่อการผลิตแอลกอฮอล์จากเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695**

ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแอลกอฮอล์ของเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 โดยมีปัจจัยที่ต้องการศึกษาทั้งหมด 5 ปัจจัยได้แก่ น้ำตาลซูโครส, $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$ และปริมาณกล้าเชื้อ เพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะเขย่าที่ 120 รอบ/นาที นาน 16 ชั่วโมงโดยทำการกลั่นกรองปัจจัยโดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman ผลการทดลองดังแสดงในตารางจ-1

**ตารางที่ จ-1** ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ผลิตได้ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

| สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ | ปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละ) |
|---|---|
| 1 | 3.23 $\pm$0.28 |
| 2 | 2.96 $\pm$0.19 |
| 3 | 2.64 $\pm$0.10 |
| 4 | 2.25 $\pm$0.21 |
| 5 | 2.09 $\pm$0.14 |
| 6 | 3.00 $\pm$0.23[a] |
| 7 | 2.28 $\pm$0.13 |
| 8 | 2.63 $\pm$0.11 |
| 9 | 2.68$\pm$0.12 |
| 10 | 2.11 $\pm$0.18 |
| 11 | 2.56 $\pm$0.13 |
| 12 | 2.50 $\pm$0.14 |

**หมายเหตุ** : ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

:อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นำค่าเฉลี่ยปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากตาราง จ-1 ป้อนข้อมูลในโปรแกรมสำเร็จรูป Plackett and Burman (N=12) จากนั้นโปรแกรมจะทำการวิเคราะห์ผล โดยรายงานผลทางสถิติในรูปของค่า Student-T (t) ดังแสดงในตาราง จ-2

**ตารางที่ จ-2** ค่า t ที่วิเคราะห์ผลจากการเติมสารอาหารและกล้าเชื้อในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแอลกอฮอล์จากเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695

| Input Variable | Response Variable |
|---|---|
| | ปริมาณแอลกอฮอล์ |
| น้ำตาลซูโครส | 0.360 |
| $(NH_4)_2HPO_4$ | -0.031 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | -0.649 |
| $MgSO_4$ | 0.869 |
| ปริมาณกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 | 3.285 [e] |

**หมายเหตุ** : ค่า Degree of freedom เท่ากับ 6

: อักษร e หมายถึงมีระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า t-table เท่ากับ 2.447

จากตาราง จ-2 พบว่าการเติมปริมาณกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 มีผลต่อปริมาณแอลกฮอล์ที่เชื้อผลิตได้มากที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ95 (t=2.447) โดยการพิจารณาความแตกต่างทางสถิตินี้ดูจากค่า t คือการทดลองนี้พบว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นมีค่า t จากการคำนวณเท่ากับ 3.285 ซึ่งทีค่ามากกว่าค่า t ตารางที่มีค่าเท่ากับ 2.447 (ตารางค่า t-test) แสดงว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ95

ดังนั้นสรุปได้ว่าปัจจัยหลักคือปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเนื่องมากมีผลมากต่อเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ในการผลิตแอลกอออล์จะนำไปศึกษาหาปริมาณการเติมที่เหมาะสมต่อไป และปัจจัยรองคือปัจจัยที่มีผลน้อยต่อเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ในการผลิตแอลกอออล์ ในงานทดลองนี้คือ น้ำตาลซูโครส, $(NH_4)_2HPO_4$,$(NH_4)_2SO_4$ และ $MgSO_4$ ซึ่งจะเลือกเติมที่ระดับต่ำ หรือจะไม่เติมขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงานวิจัยเป็นหลัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**ผลศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอเซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อทดลองเลี้ยงในสภาวะเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695 เพื่อผลิตไบโอเซลลูโลส**

การศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อทำการเจริญร่วมกับ *K. fragilis* TISTR 5695 โดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman ซึ่งประกอบด้วยสิ่งทดลองทั้งหมด 12 เมื่อพิจารณาผลของสารอาหารและกล้าเชื้อ ที่ระดับความเชื่อมั่นตั้งแต่ร้อยละ 75 ขึ้นไป ต่อปริมาณไบโอเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรดด่าง โดยกำหนดให้ปริมาณโบโอเซลลูโลสที่เชื้อผลิตพิจารณาเป็นค่าตอบสนอง (response variable) ที่สำคัญที่สุดในการพิจารณาคัดเลือกปัจจัยที่มีผลมาก และปัจจัยที่มีผลน้อย แสดงผลการทดลองในตอนที่ 4.7.1 แต่เมื่อทำการพิจารณาผลของสารอาหารและกล้าเชื้อต่อ ปริมาณไบโอเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรดด่าง โดยเมื่อพิจารณาค่าตอบสนอง คือ ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีความสำคัญเท่ากันในการพิจารณาเพื่อทำการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลมาก และปัจจัยที่มีผลน้อย จากการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อทำการเจริญร่วมกับ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงผลค่า t ในตารางที่ จ-3

จากผลการทดลองตามตารางที่ จ-3 สามารถแบ่งปัจจัยได้ 2 แบบ คือ

1. ปัจจัยหลัก (Major factors) เป็นปัจจัยที่มีผลมากที่สุดต่อการสร้างไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญร่วมกันของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.15$) ซึ่งมี 4 ปัจจัยได้แก่

- ปริมาณกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 พบว่าการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และไบโอเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.25$)
- กล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 พบว่าการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ($p \leq 0.25$) แต่ไม่มีผลต่อปริมาณไบโอเซลลูโลส ($p > 0.25$)
- ปริมาณ $(NH_4)_2HPO_4$ พบว่าการเพิ่มปริมาณ $(NH_4)_2HPO_4$ ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือและปริมาณไบโอเซลลูโลสลดลง และมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เพิ่มขึ้น ($p \leq 0.25$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- ปริมาณน้ำตาลซูโครส พบว่าการเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครส ทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.25$) แต่ไม่มีผลต่อปริมาณไบโอเซลลูโลส และมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ($p > 0.25$)

ปัจจัยหลักจะทำการทดลองหาระดับที่เหมาะสมต่อไป โดยผันแปรช่วงระดับที่ทดลองเป็นดังนี้ ศึกษาปัจจัยสารประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

- น้ำตาลซูโครส ช่วงระดับทดลองเดิมคือร้อยละ 0-10 กำหนดใหม่เป็นร้อยละ 0-7
- ปริมาณ $(NH_4)_2HPO_4$ ช่วงระดับทดลองเดิมคือร้อยละ 0.1-0.5 กำหนดใหม่เป็นร้อยละ 0.3-0.7

ศึกษาปัจจัยปริมาณเชื้อเริ่มต้น

- ปริมาณเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ช่วงระดับทดลองเดิมคือร้อยละ 5-10 กำหนดใหม่เป็นร้อยละ 2-8
- ปริมาณเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ช่วงระดับทดลองเดิมคือร้อยละ 2-6 กำหนดใหม่เป็นร้อยละ 4-8

2. ปัจจัยรอง (Minor factors) เป็นปัจจัยที่มีผลน้อยต่อ ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และค่าความเป็นกรดด่าง สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการเจริญร่วมกันของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.15$) ซึ่งมี 1 ปัจจัยได้แก่

- ปริมาณ $MgSO_4$ พบว่าการเพิ่มปริมาณ $MgSO_4$ ไม่มีผลกระทบต่อค่าปริมาณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้ และค่าความเป็นกรดด่าง ($p > 0.25$)

สามารถกำหนดระดับการใช้ได้ดังนี้

- ปริมาณ $MgSO_4$ ใช้ระดับต่ำ คือร้อยละ 0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ จ-3** ค่า t ที่ได้จากผลของการเติมสารอาหาร และปริมาณกล้าเชื้อในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695

| Input Variable | Response Variable | | |
|---|---|---|---|
| | ไบโอเซลลูโลส | ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ | ค่าความเป็นกรด-ด่าง |
| น้ำตาลซูโครส | 0.728 | 6.993[e] | -0.106 |
| *A. xylinum* | 1.316[a] | 2.966[e] | -0.769 |
| *K. fragilis* | -0.652 | -2.827[e] | -1.833[c] |
| $(NH_4)_2HPO_4$ | -1.452[b] | -3479[e] | 6.492[e] |
| $MgSO_4$ | -0.708 | 0.173 | -0.840 |

**หมายเหตุ** : ค่า Degree of freedom เท่ากับ 6

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงถึงระดับความมีนัยสำคัญดังนี้

a หมายถึงมีระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 75 มีค่า t-table เท่ากับ 1.273

b หมายถึงมีระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 80 มีค่า t-table เท่ากับ 1.440

c หมายถึงมีระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 85 มีค่า t-table เท่ากับ 1.650

d หมายถึงมีระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 90 มีค่า t-table เท่ากับ 1.943

e หมายถึงมีระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า t-table เท่ากับ 2.447

ผลของปัจจัยทดลองที่มีต่อต่อปริมาณเซลลูโลสของ *A. xylinum* TISTR 107 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญร่วมกับเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 แสดงผลในตารางที่ จ-3 และตารางที่ 4.17 อธิบายได้ดังนี้

**น้ำตาลซูโครส** ที่ใช้เติมมีผลกระทบคือ พบว่าการเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครส ทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.25$) ดังนั้นการเติมน้ำตาลที่ระดับสูงคือร้อยละ 10 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ยที่ 14 วัน เท่ากับร้อยละ 5.38$\pm$0.07 มีปริมาณไบโอเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้เฉลี่ยร้อยละ 1.4257$\pm$0.93 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตร คิดเป็นร้อยละ 0.0671$\pm$0.05 กรัมน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยเท่ากับ 5.02$\pm$0.40 และการเติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับต่ำคือร้อยละ 0 (ไม่เติมน้ำตาลซูโครส) มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ยที่ 14 วัน เท่ากับร้อยละ 0.34$\pm$0.03 มีปริมาณไบโอเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้ เฉลี่ยเท่ากับ 0.5857$\pm$0.54 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตร คิดเป็นร้อยละ 0.0228$\pm$0.05 กรัมน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยเท่ากับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.04±0.68 ดังแสดงในตารางที่ 4.17 และ 4.19 เนื่องจากการเติมน้ำตาลที่ระดับต่ำ มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือน้อยกว่าการเติมน้ำตาลที่ระดับสูง ซึ่งเป็นผลเนื่องจากเชื้อมีการเจริญและใช้น้ำตาลได้ดีกว่าการเติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับสูง ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงกำหนดน้ำตาลที่ระดับต่ำคือร้อยละ0

**ปริมาณกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107** ที่ใช้เติมมีผลกระทบคือ พบว่าการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และไบโอเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.25$) ผลการทดลองพบว่าเมื่อเติมกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ที่ระดับสูงคือร้อยละ 10 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ยที่ 14 วัน เท่ากับร้อยละ 3.93±3.92 และมีปริมาณไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้ เฉลี่ยเท่ากับ 1.9363±3.09 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตร คิดเป็น 0.0863±0.15 กรัมน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร และการเติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับต่ำคือร้อยละ 5 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ยที่ 14 วัน เท่ากับร้อยละ 1.79±2.83 และมีปริมาณไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้ เฉลี่ยเท่ากับ 0.0762±0.09 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตร คิดเป็นร้อยละ 0.0036±0.00 กรัมน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร และมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.97±0.67, 5.09±0.39 ดังแสดงในตารางที่ 4.17 และ 4.19 จะเห็นว่าการเติมปริมาณกล้าเชื้อที่ระดับสูงคือร้อยละ 10 ให้ปริมาณไบโอเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้มากกว่าการเติมที่ระดับต่ำ แต่มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือมากกว่าการเติมที่ระดับต่ำ ซึ่งเป็นผลเนื่องจากเชื้อมีการเจริญและใช้น้ำตาลได้ดีกว่าการเติมกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ที่ระดับสูงดังนั้นการทดลองต่อไปจึงกำหนดให้ใช้ปริมาณเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ที่ระดับต่ำ

**ปริมาณกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695** ที่ใช้เติมมีผลกระทบคือ พบว่าการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ($p \leq 0.25$) การใช้ปริมาณกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ที่ระดับสูงคือร้อยละ 6 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ยที่ 14 วัน เท่ากับร้อยละ 1.84±2.31 มีปริมาณไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้ เฉลี่ยร้อยละ 0.6419±1.26 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตร คิดเป็นร้อยละ 0.0251±0.05 กรัมน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.90±0.59 และเมื่อเติมกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ระดับต่ำคือร้อยละ 2 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ยที่ 14 วัน เท่ากับร้อยละ 3.88±4.28 มีปริมาณไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้เฉลี่ยร้อยละ 1.3706±3.12 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตรคิดเป็นร้อยละ0.0647±0.15 กรัมน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.16±0.49 ดังแสดงในตารางที่ 4.17 และ 4.19 เนื่องจาก *K. fragilis* TISTR 5695 ที่ระดับสูงมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่าการเติม *K. fragilis* TISTR 5695 ที่ระดับสูง ซึ่งเป็นผลเนื่องจากการเจริญเติบโตได้ดีกว่าของเชื้อ ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงกำหนดให้ใช้ปริมาณเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ที่ระดับสูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**$(NH_4)_2HPO_4$** ที่ใช้เติมมีผลกระทบคือ พบว่าการเพิ่มปริมาณ $(NH_4)_2HPO_4$ ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือและปริมาณไบโอเซลลูโลสลดลง และมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เพิ่มขึ้น ($p \leq 0.25$) พบว่าการใช้ปริมาณ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ระดับสูงคือร้อยละ 0.5 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือที่ 14 วันเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 1.61$\pm$2.39 มีปริมาณไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้เฉลี่ยร้อยละ 0.0259$\pm$0.05 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตรคิดเป็นร้อยละ 0.00008$\pm$0.00 กรัมน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.49$\pm$0.16 และการติม$(NH_4)_2HPO_4$ ที่ระดับต่ำคือร้อยละ 0.1 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือที่ 14 วันเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 4.11$\pm$4.08 มีปริมาณไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้เฉลี่ยร้อยละ 1.9866$\pm$3.05 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตร คิดเป็นร้อยละ 0.0891$\pm$0.14 กรัมน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.57$\pm$0.32 ดังแสดงในตารางที่ 4.17 และ 4.19 เนื่องจากการเติม $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ระดับสูง ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือลดลง ดังนั้นการทดลองให้ตอนต่อไปจึงกำหนด $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ระดับสูง

**$MgSO_4$** ที่ใช้เติมมีผลกระทบคือ พบว่าการเพิ่มปริมาณ $MgSO_4$ ไม่มีผลกระทบต่อค่าปริมาณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้ และค่าความเป็นกรดด่าง ($p > 0.25$) โดยพบว่าการเติม $MgSO_4$ ที่ระดับสูงคือร้อยละ 0.05 มีปริมาณ น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือที่ 14 วันเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 2.92$\pm$23.06 มีปริมาณไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้เฉลี่ยร้อยละ 0.6021$\pm$1.27 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตร คิดเป็นร้อยละ 0.0234$\pm$0.05 กรัมน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร และมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.97$\pm$0.62 และการเติม $MgSO_4$ระดับต่ำคือไม่มีการเติม $MgSO_4$ มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือที่ 14 วันเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 2.80$\pm$4.10 ตามลำดับ มีปริมาณไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้เฉลี่ยร้อยละ 1.4104$\pm$3.11 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตร คิดเป็นร้อยละ 0.0664$\pm$0.15 กรัมน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร และมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.09$\pm$0.48 ดังแสดงในตารางที่ 4.17 และ 4.19 เนื่องจากการเติม $MgSO_4$ ไม่มีผลกระทบต่อค่าปริมาณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้ และค่าความเป็นกรดด่าง ($p > 0.25$) ดังนั้นการทดลองให้ตอนต่อไปจึงกำหนด $MgSO_4$ ที่ระดับต่ำ (คือไม่เติม $MgSO_4$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำการศึกษาโดยแยกทำการศึกษาครั้งละ 2 ปัจจัย โดยกำหนดทำการทดลอง สารประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ปริมาณน้ำตาลซูโครส กับ ปริมาณ $(NH_4)_2HPO_4$ และการทดลองในส่วนของปริมาณเชื้อเริ่มต้น คือ ปริมาณเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ ปริมาณเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 โดยศึกษาสภาวะการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695 ในน้ำเวย์ ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติตั้งแต่ร้อยละ 75 ขึ้นไป ($p \leq 0.25$) การศึกษาเลือกที่ระดับความเชื่อมั่นที่ต่ำกว่า ร้อยละ 85 เนื่องจากปัจจัยที่ทำการศึกษามีความสำคัญโดยเฉพาะปริมาณเชื้อ

*A. xylinum* TISTR 107 ซึ่งถ้าพิจารณาที่ ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 85 ปัจจัยที่มีความแตกต่างจะมีเพียง ปริมาณเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 เริ่มต้นที่ถูกกำหนดในระดับสูง คือร้อยละ 6 และ ปริมาณ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ถูกกำหนดในระดับสูง คือร้อยละ 0.5 ดังแสดงในตาราง 4.12 ซึ่งเมื่อทำการทดลองพบว่าไม่มีการสร้างไบโอเซลลูโลสในแต่ละสิ่งทดลองทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 เริ่มต้น ที่มากเจริญอย่างรวดเร็วเนื่องจากสภาวะในการเลี้ยงแบบเขย่าใน 14 ชั่วโมงแรกทำให้ *K. fragilis* TISTR 5695 สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว และหลังจากตั้งทิ้งไว้นาน 14 วัน *K. fragilis* TISTR 5695 สามารถสร้างแอลกอฮอล์ได้อีก ส่งผลให้ *A. xylinum* TISTR 107 ไม่สามารถเจริญได้เนื่องจาก *A. xylinum* TISTR 107 ถูกกำหนดในระดับต่ำคือร้อยละ 5 ดังนั้นการเลือกระดับความเชื่อมั่นที่ต่ำลงมาในระดับร้อยละ 75 ก็เพื่อเพิ่มปัจจัยในการศึกษาทดลองหาปัจจัยที่ส่งผลต่อสภาวะการเจริญร่วมกันของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695 มากขึ้น

ผลการกลั่นกรองปัจจัยทดลองทำให้ทราบว่ามีปัจจัยทดลองหลัก 2 ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตร่วมกันระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 *และ K. fragilis* TISTR 5695 ได้แก่ น้ำตาลซูโครสและ $(NH_4)_2HPO_4$ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาระดับที่เหมาะสมโดยทำการทดลองแบบ $2^2$ Factorial experiment (Central composite design,CCD) ซึ่งค่า $\alpha$ คำนวณได้ดังนี้

$$\alpha = 2^{(k-p)/4}$$

เมื่อ $\alpha$ = Length of start Point

k = 2 (Number of factor)

p = 0 (Fractionalization element)

ดังนั้น $\alpha = 2^{(2-0)/4}$

$= 1.414$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่า $\alpha$ ที่ได้จะนำมากำหนดระดับปัจจัยโดยแบ่งเป็น 5 ระดับ ระดับสูงสุดได้แก่ $+\alpha$ หรือ +1.414 และระดับต่ำสุดคือ $-\alpha$ หรือ -1.414 จากนั้นคำนวณระดับการใช้ที่ระดับ –1 และ +1 จากสูตร

$$(+1/-1) = \text{จุดกึ่งกลาง (ระดับ 0)} \pm \frac{\text{ระยะห่างจากจุดกึ่งกลางถึงจุดสูงสุด } (+\alpha) \text{ หรือจุดต่ำสุด } (-\alpha)}{\alpha}$$

ตัวอย่างเช่น เมื่อ จุดสูงสุดของน้ำตาลเท่ากับร้อยละ 7
จุดต่ำสุดของน้ำตาลเท่ากับร้อยละ 0
จุดกึ่งกลางของน้ำตาลเท่ากับร้อยละ 3.5

ระดับ +1 คำนวณได้จาก $\frac{3.5 + (7-3.5)}{1.414} = 5.98$

ระดับ -1 คำนวณได้จาก $\frac{3.5 - (3.5-0)}{1.414} = 1.02$

**ตารางที่ จ-4** ปริมาณการใช้น้ำตาลซูโครส และ $(NH_4)_2HPO_4$ ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการศึกษาเจริญของเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695

| สิ่งทดลอง | รหัส | น้ำตาล(A) | | $(NH_4)_2HPO_4$ (B) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ระดับ | ปริมาณการใช้ (ร้อยละ) | ระดับ | ปริมาณการใช้ (ร้อยละ) |
| 1 | (1) | -1 | 1 | -1 | 0.36 |
| 2 | a | +1 | 6 | -1 | 0.36 |
| 3 | b | -1 | 1 | +1 | 0.64 |
| 4 | ab | +1 | 6 | +1 | 0.64 |
| 5 | $-\alpha a$ | $-\alpha$ | 0 | 0 | 0.5 |
| 6 | $+\alpha a$ | $+\alpha$ | 7 | 0 | 0.5 |
| 7 | $-\alpha b$ | 0 | 3.5 | $-\alpha$ | 0.3 |
| 8 | $+\alpha b$ | 0 | 3.5 | $+\alpha$ | 0.7 |
| 9 | Cp1 | 0 | 3.5 | 0 | 0.5 |
| 10 | Cp2 | 0 | 3.5 | 0 | 0.5 |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองหาระดับที่เหมาะสมของน้ำตาลซูโครสและ $(NH_4)_2HPO_4$ มีสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 สูตร ดังแสดงในตาราง จ-4 ทำการวิเคราะห์ปริมาณไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรดเป็นด่าง จากการแปรปริมาณสารตามตาราง พบว่า เชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ไม่สามารถสร้างไบโอเซลลูโลสได้ เนื่องจากในสภาวะนี้เชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ถูกกำหนดไว้ที่ระดับต่ำคือร้อยละ 5 แต่ปริมาณ *K. fragilis* TISTR 5695 ถูกกำหนดที่ระดับสูงคือร้อยละ 6 ส่งผลให้ *K. fragilis* TISTR 5695 มีการเจริญที่รวดเร็วเนื่องจาก *K. fragilis* เป็นยีสต์ที่มีเอนไซม์แลคเตส (Lactase) ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลแลคโตส ที่อยู่ในน้ำเวย์เพื่อการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี (Verachtert and Mot, 1990) อีกทั้งยังมีความสามารถในการสร้างแอลกอฮอล์ อาจส่งผลให้ทำให้ *A. xylinum* TISTR 107 ไม่สามารถเจริญและสร้างไบโอเซลลูโลสได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของภัททิยา (2530) พบว่าการใช้กล้าเชื้อ *K. fragilis* เริ่มต้นร้อยละ 5 ในอาหารเหลว yest malt extract ที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบร้อยละ 5 พบว่าสามารถเจริญและผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 2.50-3.16 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นอกจากนี้ วราวุฒและคณะ (2536) พบว่าเมื่อมีการเติมเอทานอลมากว่าร้อยละ 2 ไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้จะมีความหนาและปริมาณลดลง และงานวิจัย Lapuz (1967) กล่าวว่าไม่พบการเจริญและสร้างเซลลูโลสเมื่อมีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ร้อยละ 3 และ 5 ผลการทดลองหาระดับที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 เริ่มต้น ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงปริมาณการเติมในตารางที่ จ-5 กำหนดให้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 11 และ 12 เป็นสูตรอาหารชุดควบคุม โดยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 11 เติมเฉพาะกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และกล้าเชื้อ *K. fragilis* ร้อยละ 10 และร้อยละ 2 ตามลำดับ และสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 12 เติมเฉพาะกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ร้อยละ 10 ทำการวิเคราะห์ปริมาณปริมาณไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรดเป็นด่าง พบว่าปริมาณเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้พบว่ามีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม อาจเนื่องจากการกำหนดสารอาหารที่ใช้เลี้ยงไม่เหมาะสมต่อการเจริญจะเห็นได้จากการกำหนดน้ำตาลเริ่มต้นที่ระดับต่ำคือไม่มีการเติมน้ำตาลซูโครสทำให้แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิดน้อยมาก และเนื่องจากเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 มีความสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้เป็นอย่างดี และปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ระดับสูง ส่งผลให้เชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ต่ำไม่สามารถเจริญแข่งขันได้ จึงส่งผลให้มีการเจริญและผลิตเซลลูโลสในปริมาณต่ำ ดังแสดงผลในตาราง จ-6 แสดงในภาพที่ จ-1

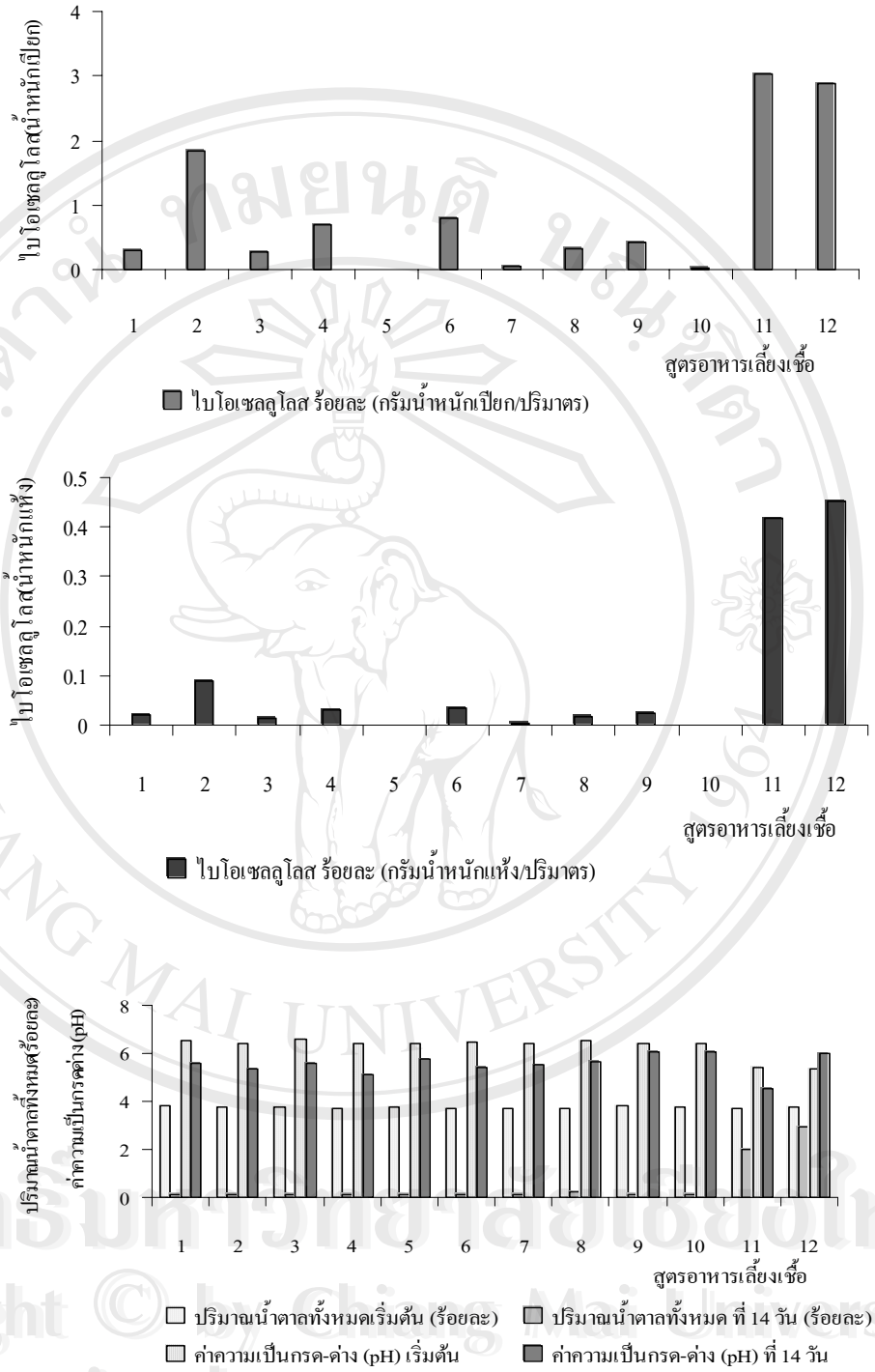
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ จ-5** ปริมาณกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ที่ใช้เติมในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาการเจริญของเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695

| สิ่งทดลอง | รหัส | *A. xylinum* TISTR 107 (A) | | *K. fragilis* TISTR 5695 (B) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ระดับ | ปริมาณการใช้ (ร้อยละ) | ระดับ | ปริมาณการใช้ (ร้อยละ) |
| 1 | (1) | -1 | 2.88 | -1 | 4.59 |
| 2 | a | +1 | 7.12 | -1 | 4.59 |
| 3 | b | -1 | 2.88 | +1 | 7.41 |
| 4 | ab | +1 | 7.12 | +1 | 7.41 |
| 5 | $-\alpha$a | $-\alpha$ | 2 | 0 | 6 |
| 6 | $+\alpha$a | $+\alpha$ | 8 | 0 | 6 |
| 7 | $-\alpha$b | 0 | 5 | $-\alpha$ | 4 |
| 8 | $+\alpha$b | 0 | 5 | $+\alpha$ | 8 |
| 9 | Cp1 | 0 | 5 | 0 | 6 |
| 10 | Cp2 | 0 | 5 | 0 | 6 |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved




**ภาพ จ-1** ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็น กรด- ด่างจากการเจริญร่วมกันของเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR107 และ *K. fragilis* TISTR 5695ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษาผลของปัจจัยหลักคือ กล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไบโอเซลลูโลสของ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 107 เมื่อเลี้ยงในสภาวะเชื้อผสมระหว่าง *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 107 และ *Kluyveromyces marxianus* var. *maxianus* TISTR 5695 ในน้ำเวย์**

จากผลการทดลองเมื่อทำการกำหนดสารอาหารในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับสูงและต่ำ โดยจากการวางแผนการทดลองแบบ plackett and Burman ที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส กล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 กล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 $(NH_4)_2HPO_4$ และ $MgSO_4$ ในระดับสูงและระดับต่ำ (สูง:ต่ำ) โดยมีสารอาหารดังกล่าวเท่ากับร้อยละ (10:0), (10:5), (6:2), (0.5:0.1) และ $MgSO_4$ เท่ากับ (0.05:0) ตามลำดับ เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 5 ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสร้อยละ 10 ปริมาณกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ร้อยละ 10 และปริมาณกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ร้อยละ 2 $(NH_4)_2HPO_4$ ร้อยละ 0.1 มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 5.94$\pm$0.12 มีปริมาณไบโอเซลลูโลสสูงสุด ร้อยละ 7.7355$\pm$0.89 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตร คิดเป็นร้อยละ 0.3675$\pm$0.41 กรัมน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้ออื่น อื่น ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.17 และภาพที่ ก-5 เนื่องจากเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่ 14 วัน สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 5 นี้ยังคงเหลือปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 9.60$\pm$1.89 จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 12.02$\pm$0.10 ซึ่งเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือในปริมาณที่สูง ดังนั้นจึงนำสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 5 มาทำการทดลองซ้ำ โดยศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญร่วมกันของเชื้อ ทำการศึกษาน้ำตาล 3 ระดับคือที่ระดับร้อยละ 0, 5 และ10 และกำหนดปริมาณ $(NH_4)_2HPO_4$ 3 ระดับคือร้อยละ 0, 0.1 และ 0.2 กำหนดกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695 ร้อยละ 10 และ 2 ตามลำดับ มีสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 10 สูตร โดยมีการเติมสารอาหารในน้ำเวย์ได้แก่ น้ำตาลซูโครส, $(NH_4)_2HPO_4$ ที่แตกต่างกันและเติม ปริมาณกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และปริมาณกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695เท่ากันในทุก ๆ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 10 เป็นสูตรอาหารชุดควบคุม เติมเฉพาะกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ร้อยละ 10 แสดงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในตารางที่ จ-7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

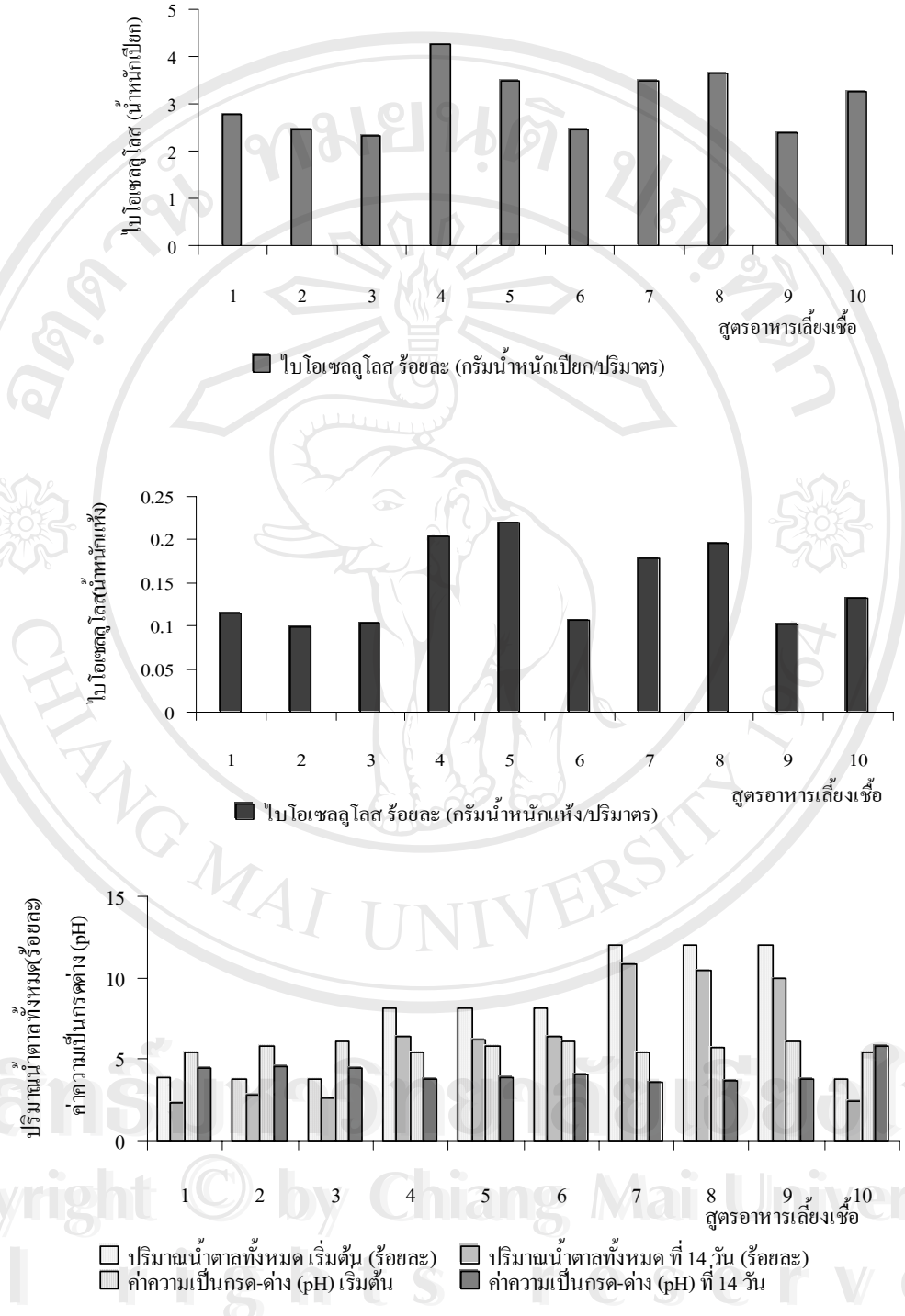
**ตารางที่ จ-7** ปริมาณสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์ของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จากทดลองเพื่อศึกษาผลของน้ำตาลซูโครส และ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการเจริญร่วมกันระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695

| สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ | น้ำตาลซูโครส | $(NH_4)_2HPO_4$ | *A. xylinum* | *K. fragilis* |
|---|---|---|---|---|
| | (ร้อยละ) | | | |
| 1 | 0 | 0 | 10 | 2 |
| 2 | 0 | 0.1 | 10 | 2 |
| 3 | 0 | 0.2 | 10 | 2 |
| 4 | 5 | 0 | 10 | 2 |
| 5 | 5 | 0.1 | 10 | 2 |
| 6 | 5 | 0.2 | 10 | 2 |
| 7 | 10 | 0 | 10 | 2 |
| 8 | 10 | 0.1 | 10 | 2 |
| 9 | 10 | 0.2 | 10 | 2 |
| 10 | 0 | 0 | 10 | 0 |

พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 5 ที่ประกอบด้วยปริมาณน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 ปริมาณ $(NH_4)_2HPO_4$ ร้อยละ 0.1 กล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ร้อยละ10 และกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ร้อยละ 2 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.38 ให้ปริมาณไบโอเซลลูโลสที่สูงสุด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) คือร้อยละ 4.4696$\pm$1.53 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตรและ ร้อยละ 0.7706$\pm$0.32 กรัมน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร ดังแสดงในตารางที่ จ-8 และภาพที่ จ-2 ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เริ่มต้นร้อยละ 10 เป็นปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญ (วราวุฒิ, 2536) และการเติมปริมาณกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ร้อยละ 2 ทำให้ยีสต์ชนิดนี้มีการเจริญเพียงเล็กน้อยลดการเจริญแข่งขันและสามารถสร้างแอลกอฮอล์เพื่อใช้ในการเจริญและเพื่อสร้างไบโอเซลลูโลสของ *A. xylinum* TISTR 107 ทั้งนี้ *A. xylinum* TISTR 107 อาจใช้ประโยชน์จากสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ให้เป็นประโยชน์ได้ด้วย โดยมีรายงานของ Revillion และคณะ (2003) พบว่า *K. fragilis* สามารถผลิตสารสกัดจากยีสต์ (nucleotide-rich yeast extract) จากน้ำเวย์ได้ 20 กรัม/ลิตร โดยสารสกัดดังกล่าวมีโดยประกอบด้วย crude protein ไขมัน เถ้า ความชื้น คาร์โบโฮเดรต 520, 5.4, 72, 54, และ348.6 มิลลิกรัม/กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved




**ภาพที่ จ-2** ปริมาณไบโอเซลลูโลส ไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญเพื่อผลิตไบโอเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อเจริญร่วมกันกับเชื้อ *K. fragilis* TISTR ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษาผลการเติมน้ำตาลซูโครส และ $(NH_4)_2HPO_4$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**ผลการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเพื่อผลิตไบโอเซลลูโลสของ *A. xylinum* TISTR 107 ในสภาวะและสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะสม และการเจริญร่วมกันเพื่อผลิตไบโอเซลลูโลสของ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อเจริญร่วมกับเชื้อ *K. maxianus* TISTR 5695**

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเพื่อผลิตไบโอเซลลูโลสของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะสมต่อการเจริญและผลิตไบโอเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และการเจริญร่วมกันของเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695ในน้ำเวย์ที่มีการเติมสารอาหาร ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. xylinum* TISTR 107 พบว่าในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 7 และปริมาณเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เริ่มต้นร้อยละ 5 ผลิตไบโอเซลลูโลสได้สูงสุดเท่ากับ 10.8885$\pm$1.95 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตร 0.5910$\pm$0.20 กรัมน้ำหนักแห้ง/ปริมาตร($p \leq 0.05$) และ จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญร่วมกันของ *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695 พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 $(NH_4)_2HPO_4$ ร้อยละ 0.1 กล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ร้อยละ 10 และกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ร้อยละ 2 ได้ปริมาณไบโอเซลลูโลสสูงสุดร้อยละ 14.9066$\pm$4.93กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตร 0.7706$\pm$0.32 กรัม น้ำหนักแห้ง/350 มิลลิลิตร($p \leq 0.05$) ทำการทดลองในสภาวะตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน และการศึกษาในสภาวะเขย่าที่ 120 รอบ/นาที นาน 14 ชั่วโมงจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 14 วัน สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารอาหารต่าง ๆ ลงในน้ำเวย์ ดังแสดงในตาราง จ-9

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ จ-9** สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซลลูโลสของ *A. xylinum* TISTR 107 และ การเจริญร่วมกันระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. maxianus* TISTR 5695 ในน้ำเวย์

| สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ | น้ำตาลซูโครส | $(NH_4)_2HPO_4$ | *A. xylinum* TISTR 107 | *K. fragilis* TISTR 5695 | หมายเหตุ |
|---|---|---|---|---|---|
| | (ร้อยละ) | | | | |
| 1 | 7 | 0 | 5 | 0 | S |
| 2 | 7 | 0 | 10 | 0 | S |
| 3 | 7 | 0 | 5 | 0 | A |
| 4 | 7 | 0 | 10 | 0 | A |
| 5 | 5 | 0 | 10 | 2 | A |
| 6 | 10 | 0.1 | 10 | 2 | A |
| 7 | 5 | 0 | 10 | 2 | S |
| 8 | 10 | 0.1 | 10 | 2 | S |
| 9 | 0 | 0 | 10 | 0 | A |
| 10 | 0 | 0 | 10 | 2 | A |
| 11 | 0 | 0 | 10 | 0 | S |
| 12 | 0 | 0 | 10 | 2 | S |

**หมายเหตุ** : S คือ การเลี้ยงในสภาวะตั้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

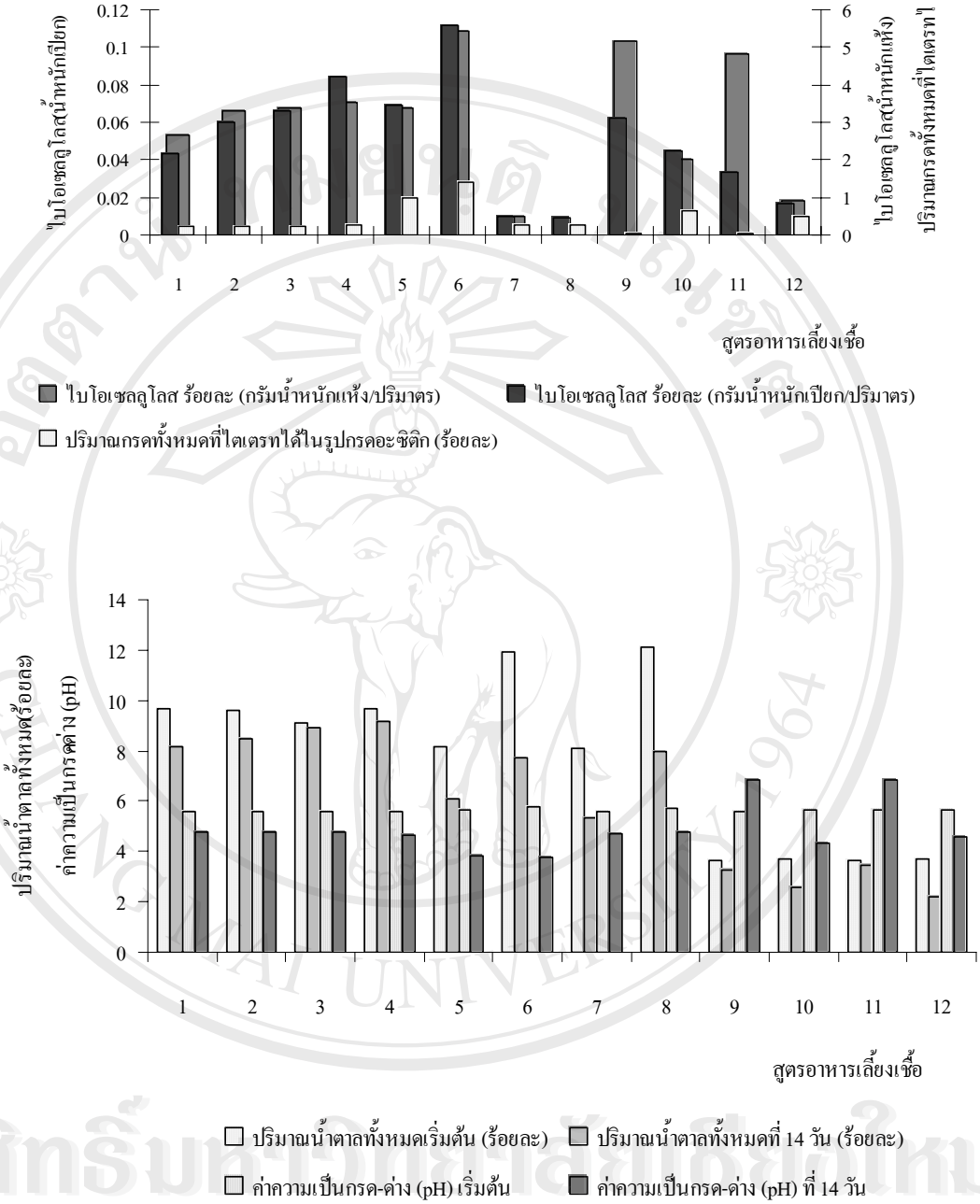
: A คือ การเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ 120 รอบ/นาที นาน 14 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้เป็นหลักพบว่า สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 6 ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 $(NH_4)_2HPO_4$ ร้อยละ 0.1 เติมปริมาณเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เริ่มต้นร้อยละ 10 และเติมปริมาณเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 เริ่มต้นร้อยละ 2 เลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่ 120 รอบ/นาทีนาน14 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณไบโอเซลลูโลสสูงสุดคือ 19.5414±4.13 กรัมน้ำหนักเปียก/ปริมาตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก พบว่ามีปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ในรูปกรดอะซีติกเท่ากับ 1.39±0.29 ซึ่ง *Acetobacter. xylinum* สามารถเจริญและออกซิไดซ์ กรดอะซีติกได้พลังงาน (ATP) เพื่อนำมาสร้างเซลลูโลสได้ (Vandamme et al., 1997) แต่เมื่อพิจารณาไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้ในรูปน้ำหนักแห้งพบว่า สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 6 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 9 และ 11 ที่มีการเติม เพียงปริมาณกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เริ่มต้นร้อยละ 10 เท่านั้น โดย สิ่งทดลองที่ 9 เลี้ยงในสภาวะเขย่า 120 รอบ/นาที นาน 14 ชั่วโมงจากนั้นตั้งทิ้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ สิ่งทดลองที่ 11 เลี้ยงในสภาวะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยผลิตไบโอเซลลูโลสเท่ากับ 0.3796±0.09, 0.3619±0.01 และ 0.3363±0.01กรัมน้ำนักแห้ง/350มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงผลการทดลองในตารางที่ จ-10 และภาพที่ จ-3 ทั้งนี้อาจเนื่องจากน้ำเวย์มีสารอาหาเพียงพอต่อการเจริญของ *A. xylinum* TISTR 107 เพื่อผลิตไบโอเซลลูโลส โดยไม่มีความจำเป็นต้องเติมสารอาหารต่าง ๆ ลงไปอีก ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเติม $(NH_4)_2HPO_4$ มีสมบัติเป็นสารละลายบัปเฟอร์ และเป็นแหล่ง ของไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ( Toda, 2000) ส่งเสริมให้มีการเจริญของ *A. xylinum* TISTR 107 เจริญอย่างรวดเร็วส่งผลให้ไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้มีการก่อผลึกได้อย่างหลวม ๆ เกิดรูและโพรงภายในโครงสร้าง (Cannon et al., 1989) ดังนั้นไบโอเซลลูโลสที่ผลิตได้อาจมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved




ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**ภาพที่ จ-3** ปริมาณไบโอเซลลูโลส ความชื้นของไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด การใช้น้ำตาล และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซลลูโลสของ *A. xylinum* TISTR 107 ที่เจริญแบบเชื้อเดี่ยว และการเจริญร่วมกับเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695

## ประวัติผู้เขียน

**ชื่อสกุล** นางสาวศศิธร ศรียะธาตุ

**วัน เดือน ปีเกิด** 25 สิงหาคม 2521

**ประวัติการศึกษา**
- มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสิรินธร จังหวัดสุรินทร์ 2540
- ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการอาหารและโภชนาศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 2545

**ประสบการณ์** ปี พ.ศ. 2547-2548 ทำงานในตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัยในโครงการ คุณภาพเนยแข็งรสสมุนไพร และการบำบัดน้ำเวย์เพื่อใช้ผลิต แซนแทนกัม และไบโอเซลลูโลส ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ จ-6** ปริมาณไบโอเซลลูโลส ความชื้นของไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด การใช้น้ำตาล ค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญร่วมกันของเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR107 และ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษาผลของปัจจัยหลักคือ กล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 กล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 $(NH_4)_2HPO_4$ และน้ำตาลซูโครส

| สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ | ปริมาณไบโอเซลลูโลส กรัมน้ำหนักเปียกต่อปริมาตร (ร้อยละ) | ปริมาณไบโอเซลลูโลส กรัมน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (ร้อยละ) | ความชื้นของไบโอเซลลูโลส (ร้อยละ) | ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น (ร้อยละ) | ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือที่ 14 วัน (ร้อยละ) | การใช้น้ำตาล (ร้อยละ) | ความเป็นกรด – ด่าง (pH) | ความเป็นกรด – ด่าง (pH) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | $0.3008^{d}\pm0.10$ | $0.0189^{bc}\pm0.01$ | 98.84 | 3.64±0.15 | < 0.13 | >3.51 | 5.56±0.00 | 5.57±0.09 |
| 2 | $1.8341^{bc}\pm0.50$ | $0.0880^{ab}\pm0.02$ | 98.52 | 3.71±0.01 | < 0.13 | >3.58 | 6.44±0.01 | 3.34±0.05 |
| 3 | $0.2728^{d}\pm0.39$ | $0.0123^{c}\pm0.02$ | 97.28 | 3.70±0.08 | < 0.13 | >3.57 | 6.44±0.01 | 5.59±0.54 |
| 4 | $0.7026^{cd}\pm0.03$ | $0.0315^{bc}\pm0.02$ | 98.52 | 3.61±0.15 | < 0.13 | >3.48 | 6.61±0.00 | 5.14±0.11 |
| 5 | ND | ND | ND | 3.63±0.21 | < 0.13 | >3.50 | 6.44±0.02 | 5.76±0.47 |
| 6 | $0.8070^{cd}\pm0.48$ | $0.0332^{bc}\pm0.02$ | 97.54 | 3.71±0.08 | < 0.13 | >3.58 | 6.46±0.01 | 5.39±0.10 |
| 7 | $0.0578^{d}\pm0.05$ | $0.0034^{c}\pm0.00$ | 97.84 | 3.74±0.12 | < 0.13 | >3.62 | 6.43±0.00 | 5.50±0.10 |
| 8 | $0.3244^{d}\pm0.34$ | $0.0172^{bc}\pm0.01$ | 98.25 | 3.69±0.09 | 0.24±0.15 | 3.45 | 6.51±0.01 | 5.66±0.18 |
| 9 | $0.4181^{d}\pm0.30$ | $0.0229^{bc}\pm0.02$ | 98.12 | 3.75±0.23 | < 0.13 | >3.62 | 6.43±0.02 | 6.06±0.02 |
| 10 | $0.0156^{d}\pm0.02$ | $0.0005^{c}\pm0.00$ | 98.16 | 3.71±0.08 | < 0.13 | >3.58 | 6.44±0.00 | 6.07±0.03 |
| 11 | $3.0350^{a}\pm0.34$ | $0.4180^{a}\pm0.03$ | 98.45 | 3.70±0.07 | 1.99±0.23 | 1.71 | 5.40±0.00 | 4.54±0.01 |
| 12 | $2.8877^{ab}\pm0.12$ | $0.4523^{a}\pm0.01$ | 95.64 | 3.81±0.05 | 2.92±0.12 | 0.89 | 5.38±0.01 | 5.99±0.02 |

**หมายเหตุ** : ค่าของข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

: อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

: ND คือไม่พบการสร้างไบโอเซลลูโลส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ จ-8** ผลการวิเคราะห์ปริมาณไบโอเซลลูโลส ความชื้นของไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด การใช้น้ำตาล และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญร่วมกันของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษาการเติมน้ำตาลซูโครส และ $(NH_4)_2HPO_4$

| สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ | ปริมาณไบโอเซลลูโลส กรัมน้ำหนักเปียกต่อปริมาตร (ร้อยละ) | ปริมาณไบโอเซลลูโลส กรัมน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (ร้อยละ) | ปริมาณความชื้นของไบโอเซลลูโลส (ร้อยละ) | ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เริ่มต้น (ร้อยละ) | ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ 14 วัน (ร้อยละ) | การใช้น้ำตาล (ร้อยละ) | ความเป็นกรด – ด่าง (pH) เริ่มต้น | ความเป็นกรด – ด่าง (pH) ที่ 14 วัน | ค่า pH ที่เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.7619 $^{bc}$±0.49 | 0.1147 $^{cd}$±0.03 | 95.85 | 3.82 $^{c}$±0.05 | 2.31 $^{c}$±0.55 | 1.52 | 5.39 $^{d}$±0.01 | 4.45 $^{bc}$±0.27 | 0.94 |
| 2 | 2.4530 $^{c}$±0.62 | 0.0983 $^{c}$±0.01 | 95.99 | 3.79 $^{c}$±0.03 | 2.78 $^{c}$±0.22 | 1.01 | 5.77 $^{c}$±0.01 | 4.56 $^{b}$±0.29 | 1.21 |
| 3 | 2.3092 $^{c}$±0.61 | 0.1030 $^{c}$±0.03 | 95.54 | 3.76 $^{c}$±0.04 | 2.59 $^{b}$±0.12 | 1.17 | 6.11 $^{a}$±0.01 | 4.47 $^{bc}$±0.09 | 1.65 |
| 4 | 4.2590 $^{ab}$±1.53 | 0.2041 $^{ab}$±0.02 | 94.83 | 8.09 $^{b}$±0.02 | 6.38 $^{b}$±0.47 | 1.71 | 5.38 $^{de}$±0.00 | 3.74 $^{cd}$±0.36 | 1.64 |
| 5 | 4.4696 $^{a}$±0.68 | 0.2202 $^{a}$±0.09 | 95.43 | 8.13 $^{b}$±0.04 | 6.17 $^{b}$±0.67 | 1.96 | 5.76 $^{c}$±0.01 | 3.89 $^{bcd}$±0.33 | 1.87 |
| 6 | 2.4487 $^{c}$±0.45 | 0.1060 $^{c}$±0.02 | 95.67 | 8.09 $^{b}$±0.02 | 6.41 $^{c}$±0.23 | 1.68 | 6.10 $^{a}$±0.01 | 4.08 $^{bcd}$±0.31 | 2.02 |
| 7 | 3.4905 $^{abc}$±0.68 | 0.1789 $^{abc}$±0.03 | 94.87 | 12.03 $^{a}$±0.08 | 10.81 $^{a}$±0.34 | 1.22 | 5.37 $^{e}$±0.01 | 3.58 $^{d}$±0.30 | 1.80 |
| 8 | 3.6530 $^{abc}$±0.54 | 0.1959 $^{ab}$±0.02 | 94.64 | 12.00 $^{a}$±0.08 | 10.49 $^{a}$±0.07 | 1.51 | 5.75 $^{c}$±0.01 | 3.71 $^{cd}$±0.37 | 2.04 |
| 9 | 2.3883 $^{c}$±0.24 | 0.1020 $^{c}$±0.01 | 95.73 | 12.02 $^{a}$±0.03 | 9.98 $^{a}$±0.66 | 2.04 | 6.08 $^{b}$±0.01 | 3.76 $^{cd}$±0.33 | 2.32 |
| 10 | 3.2450 $^{abc}$±0.66 | 0.1323 $^{bcd}$±0.05 | 92.81 | 3.77 $^{c}$±0.07 | 2.46 $^{c}$±0.46 | 1.32 | 5.39 $^{de}$±0.01 | 5.77 $^{a}$±0.12 | -0.38 |

**หมายเหตุ** : ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

: อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตารางที่ จ-10** ปริมาณไบโอเซลลูโลส ความชื้นของไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด การใช้น้ำตาล และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซลลูโลสของ *A. xylinum* TISTR 107 ที่เจริญแบบเชื้อเดี่ยว และการเจริญร่วมกับเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695

| สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ | ไบโอเซลลูโลส กรัมน้ำหนักเปียกต่อปริมาตร (ร้อยละ) | ไบโอเซลลูโลส กรัมน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (ร้อยละ) | ปริมาณความชื้นของไบโอเซลลูโลส (ร้อยละ) | ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เริ่มต้น (ร้อยละ) | ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ 14 วัน (ร้อยละ) | การใช้น้ำตาล (ร้อยละ) | ความเป็นกรด – ด่าง (pH) เริ่มต้น | ความเป็นกรด – ด่าง (pH) ที่ 14 วัน | ค่า pH ที่เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น | ปริมาณกรดทั้งหมด *ที่ 14 วัน (ร้อยละ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.1713 $^{cd}$ ±0.31 | 0.0533 $^{bc}$ ±0.00 | 97.52 | 9.69 $^{c}$ ±0.09 | 8.18 $^{ab}$ ±2.26 | 1.51 | 5.60 $^{fg}$ ±0.01 | 4.75 $^{bc}$ ±0.02 | 0.85 | 0.23 $^{de}$ ±0.01 |
| 2 | 3.0040 $^{bcd}$ ±0.08 | 0.0660 $^{b}$ ±0.00 | 97.80 | 9.58 $^{d}$ ±0.05 | 8.47 $^{ab}$ ±1.52 | 1.11 | 5.59 $^{g}$ ±0.00 | 4.76 $^{bc}$ ±0.05 | 0.83 | 0.23 $^{de}$ ±0.01 |
| 3 | 3.2966 $^{bc}$ ±1.19 | 0.0678 $^{b}$ ±0.02 | 97.88 | 9.08 $^{e}$ ±0.02 | 8.91 $^{a}$ ±1.04 | 0.18 | 5.60 $^{fg}$ ±0.00 | 4.74 $^{bcd}$ ±0.02 | 0.86 | 0.24 $^{de}$ ±0.01 |
| 4 | 4.2180 $^{b}$ ±0.55 | 0.0706 $^{b}$ ±0.01 | 98.29 | 9.64 $^{cd}$ ±0.03 | 9.15 $^{a}$ ±0.38 | 0.49 | 5.57 $^{h}$ ±0.01 | 4.63 $^{cd}$ ±0.06 | 0.94 | 0.26 $^{d}$ ±0.03 |
| 5 | 3.4435 $^{bc}$ ±1.27 | 0.0675 $^{b}$ ±0.03 | 98.05 | 8.16 $^{f}$ ±0.01 | 6.06 $^{bc}$ ±0.60 | 2.10 | 5.65 $^{d}$ ±0.01 | 3.86 $^{f}$ ±0.15 | 1.79 | 0.98 $^{b}$ ±0.04 |
| 6 | 5.5833 $^{a}$ ±1.18 | 0.1085 $^{a}$ ±0.03 | 98.06 | 11.92 $^{b}$ ±0.01 | 7.74 $^{abc}$ ±2.06 | 4.18 | 5.76 $^{a}$ ±0.01 | 3.76 $^{f}$ ±0.13 | 2.00 | 1.39 $^{a}$ ±0.29 |
| 7 | 0.4949 $^{f}$ ±0.27 | 0.0102 $^{e}$ ±0.00 | 97.78 | 8.10 $^{g}$ ±0.03 | 5.32 $^{cd}$ ±2.07 | 2.75 | 5.61 $^{ef}$ ±0.01 | 4.69 $^{bcd}$ ±0.04 | 0.92 | 0.27 $^{d}$ ±0.04 |
| 8 | 0.4629 $^{f}$ ±0.67 | 0.0055 $^{e}$ ±0.00 | 98.17 | 12.09 $^{a}$ ±0.01 | 7.96 $^{abc}$ ±2.7 | 4.13 | 5.70 $^{b}$ ±0.01 | 4.80 $^{b}$ ±0.06 | 0.90 | 0.28 $^{d}$ ±0.02 |
| 9 | 3.1081 $^{bc}$ ±0.45 | 0.1034 $^{a}$ ±0.00 | 96.63 | 3.67 $^{hi}$ ±0.06 | 3.28 $^{de}$ ±0.80 | 0.39 | 5.60 $^{fg}$ ±0.02 | 6.85 $^{a}$ ±0.09 | -1.25 | 0.04 $^{e}$ ±0.00 |
| 10 | 2.2592 $^{cd}$ ±0.61 | 0.0401 $^{cd}$ ±0.00 | 98.16 | 3.70 $^{hi}$ ±0.02 | 2.54 $^{e}$ ±0.14 | 1.15 | 5.62 $^{e}$ ±0.02 | 4.33 $^{e}$ ±0.05 | 1.29 | 0.64 $^{c}$ ±0.01 |
| 11 | 1.6823 $^{def}$ ±0.31 | 0.0961 $^{a}$ ±0.00 | 94.20 | 3.62 $^{i}$ ±0.07 | 3.47 $^{de}$ ±0.18 | 0.15 | 5.62 $^{e}$ ±0.01 | 6.85 $^{a}$ ±0.08 | -1.23 | 0.04 $^{e}$ ±0.00 |
| 12 | 0.8383 $^{ef}$ ±0.94 | 0.0184 $^{de}$ ±0.01 | 96.24 | 3.70 $^{h}$ ±0.01 | 2.20 $^{e}$ ±0.22 | 1.50 | 5.68 $^{c}$ ±0.01 | 4.60 $^{d}$ ±0.13 | 1.08 | 0.50 $^{c}$ ±0.23 |

**หมายเหตุ** : ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

: อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

: * ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ในรูปกรดอะซีติก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved