สารบาญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบาญตาราง	ช
สารบาญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง	39
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์	53
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	108
เอกสารอ้างอิง	111
ภาคผนวก	117
ประวัติผู้เขียน	167

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างไบโอเซลลูโลส	7
2.2	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
2.3	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลลูโลสโดย *A. xylinum*	32
2.4	หน้าที่ของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย	34
2.5	ธาตุอาหารหลักและหน้าที่ในเซลล์แบคทีเรีย	35
3.1	การกำหนดระดับสูง-ต่ำของการใช้สารอาหารในน้ำเวย์ เพื่อศึกษาผลของสารอาหารต่อการผลิตแอลกอฮอล์ของเชื้อ *K. fragilis*. TISTR 5695	46
3.2	การกำหนดระดับของสารอาหารในการใช้แผนการทดลอง Plackett and Burman Design (N = 12) เพื่อกลั่นกรองชนิดและปริมาณสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์	46
3.3	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลกอฮอล์ของ *K. fragilis*. TISTR 5695	47
3.4	การกำหนดระดับสูง-ต่ำของการเติมสารอาหารในน้ำเวย์ ใช้แผนการทดลอง Plackett and Burman Design (N = 12) เพื่อทำการคัดเลือกสารอาหารที่มีผลต่อการสร้างไบโอเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107	49
3.5	สารอาหารที่เติมในน้ำเวย์ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แผนการทดลอง Plackett and Burman เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซลลูโลส จากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107	50
3.6	ปริมาณ และระดับการเติมสารอาหารในน้ำเวย์ ในระดับสูง-ต่ำ เพื่อทำการคัดเลือกสารอาหารที่มีผลต่อการผลิตไบโอเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อ *K. fragilis*. TISTR 5695	51

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์ เพื่อศึกษาการเจริญร่วมกันเพื่อสร้างไบโอเซลลูโลส ของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 กับ เชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695	52
4.1	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณโปรตีนของน้ำเวย์ที่ผ่าน และไม่ผ่านการแยกตะกอนโปรตีน	53
4.2	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น จากการเจริญของ *A. xylinum* TISTR 107 ที่เจริญในน้ำเวย์ที่ผ่านและไม่ผ่านการแยกตะกอน	54
4.3	ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ผลิตได้ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	57
4.4	ค่า t ที่วิเคราะห์จากผลของการเติมสารอาหารและกล้าเชื้อในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อ การผลิตแอลกอฮอล์จากการเจริญเติบโตของ เชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695	60
4.5	ค่าเฉลี่ยปริมาณแอลกอฮอล์ จากการเจริญของเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เติมสารอาหารที่ระดับสูง-ต่ำ ในน้ำเวย์	60
4.6	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ แอลกอฮอล์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อ *K. fragilis* TISIR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากการกลั่นกรองปัจจัยที่เติมในระดับสูง-ต่ำในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	63
4.7	ค่า t ที่วิเคราะห์จากผลของการเติมสารอาหารและกล้าเชื้อในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ แอลกอฮอล์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญเติบโตของ *K. fragilis* TISTR 5695	66
4.8	ค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณแอลกอฮอล์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ในน้ำเวย์ที่มีการเติมสารอาหารที่ระดับสูง-ต่ำ	66
4.9	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณแอลกอฮอล์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695	70
4.10	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ความชื้นของไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด การใช้น้ำตาล ค่าความเป็นกรด-ด่างของสูตรอาหาร จากการกลั่นกรองสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์ต่อการผลิตไบโอเซลลูโลสของ *A. xylinum* TISTR 107	73

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.11	ค่า t ที่วิเคราะห์จากผลของการเติมสารอาหารและกล้าเชื้อที่มีผลต่อปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่าง หลังจากเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	76
4.12	ค่าเฉลี่ยปริมาณไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารอาหารในน้ำเวย์ ที่ระดับสูง-ต่ำ	77
4.13	ปริมาณสารอาหารในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครสและ กรดอะซีติก ที่เหมาะสมต่อการสร้างไบโอเซลลูโลสจาก *A. xylinum* TISTR 107	82
4.14	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ความชื้นของไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด การใช้น้ำตาล ค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังทำการกลั่นกรองสารอาหาร ได้ปัจจัยหลักเป็นปริมาณน้ำตาลซูโครส และ กรดอะซีติก	84
4.15	ปริมาณสารอาหารในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ในน้ำเวย์ เพื่อศึกษาผลของการเติมสารอาหารและกล้าเชื้อ ต่อการเจริญ และสร้างไบโอเซลลูโลส	85
4.16	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ความชื้นของไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด การใช้น้ำตาล ค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 ในของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	87
4.17	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ความชื้นของไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด การใช้น้ำตาล ค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญเพื่อผลิตไบโอเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อเจริญร่วมกันกับเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการกลั่นกรองสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์ที่ระดับสูง-ต่ำ	90
4.18	ค่า t จากผลของการเติมสารอาหาร และปริมาณกล้าเชื้อในน้ำเวย์ของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญร่วมกันระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695	93

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.19	ค่าเฉลี่ยปริมาณไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญเพื่อผลิตไบโอเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อเจริญร่วมกับเชื้อ *K. fragilis* TISIR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อกลั่นกรองคัดเลือกสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์ที่ระดับสูง-ต่ำ	94
4.20	สูตรอาหารในน้ำเวย์ เพื่อศึกษาผลของการเติมปริมาณกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการสร้างไบโอเซลลูโลสของ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อเจริญร่วมกับเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695	98
4.21	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ความชื้นของไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด การใช้น้ำตาล และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญร่วมกันของ *A. xylinum* TISTR107 และ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยศึกษาผลของปัจจัยหลักคือ ปริมาณการเติมกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ $(NH_4)_2HPO_4$	101
4.22	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ความชื้นของไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด การใช้น้ำตาล ค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญร่วมกันของเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR107 และ*K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษาผลของปัจจัยหลักคือ กล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ $(NH_4)_2HPO_4$ เปรียบเทียบกับตัวอย่างชุดควบคุม	103
4.23	ค่า Biochemical Oxygen Demand ในน้ำเวย์	105
จ-1	ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ผลิตได้ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	144
จ-2	ค่า t ที่วิเคราะห์ผลจากการเติมสารอาหารและกล้าเชื้อในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	145
จ-3	ต่อการผลิตแอลกอฮอล์จากเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695	148
จ-3	ค่า t ที่ได้จากผลของการเติมสารอาหาร และปริมาณกล้าเชื้อในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อปริมาณเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695	
จ-4	ปริมาณการใช้น้ำตาลซูโครส และ $(NH_4)_2HPO_4$ ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการศึกษาเจริญของเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695	152

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จ-5	ปริมาณกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และกล้าเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ที่ใช้เติมในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาการเจริญของเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695	154
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	155
จ-7	ปริมาณสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์ของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการทดลองเพื่อศึกษาผลของน้ำตาลซูโครส และ $(NH_4)_2HPO_4$ ต่อการเจริญร่วมกันระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695	158
จ-8	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ความชื้นของไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด การใช้น้ำตาล และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญร่วมกันของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษาการเติมน้ำตาลซูโครส และ $(NH_4)_2HPO_4$	159
จ-9	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซลลูโลส ของ *A. xylinum* TISTR 107 และ การเจริญร่วมกันระหว่าง *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. maxianus* TISTR 5695 ในน้ำเวย์	162
จ-10	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ความชื้นของไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด การใช้น้ำตาล และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญและสร้างไบโอเซลลูโลสของ *A. xylinum* TISTR 107 ที่เจริญแบบเชื้อเดี่ยว และเจริญร่วมกับเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	164

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพ

ภาพ		หน้า
2.1	แผนผังการใช้ประโยชน์น้ำเวย์ทางด้านการค้าและการศึกษาในปัจจุบัน	6
2.2	โครงสร้างของไบโอเซลลูโลสไมโครไฟบริล เปรียบเทียบกับ Fringed micelles เซลลูโลสไฟบริลจากพืช	8
2.3	เส้นใยไบโอเซลลูโลส และเซลลูโลสจากพืช	8
2.4	แบบจำลองการสร้าง subfibrils cellulose ของเชื้อ *A. xylinum*	9
2.5	วิถี carbon metabolism ของ *A. xylinum*	10
2.6	อนุภาคของไบโอเซลลูโลสที่เลี้ยงในสภาวะนิ่ง และอนุภาคของไบโอเซลลูโลสที่เลี้ยงในสภาวะเขย่า	11
2.7	กลไกการผลิตไบโอเซลลูโลส (BC) จากฟรุคโตสขณะที่มี เอทานอล หรือแลคเตท	31
3.1	ขั้นตอนการเตรียมน้ำเวย์	42
4.1	แนวโน้มการเจริญของ *A. xylinum* TISTR 10 ในน้ำเวย์ที่ผ่านการแยกตะกอนโปรตีน และไม่เติมสารอาหารอื่นใด	58
4.2	แนวโน้มการเจริญของ *K. fragilis* TISTR 5695 ในน้ำเวย์ ที่ผ่านการแยกตะกอนโปรตีน และไม่เติมสารอาหารอื่นใด	59
ก-1	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณแอลกอฮอล์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อ *K. fragilis* TISIR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากการกลั่นกรองชนิดและปริมาณสารอาหารที่เติมในระดับสูง-ต่ำ	118
ก-2	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของ *A. xylinum* TISTR 107 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อกลั่นกรองชนิดและปริมาณสารอาหารที่เติมในน้ำเวย์	119
ก-3	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเลี้ยง *A. xylinum* TISTR 107 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังทำการกลั่นกรองสารอาหาร ได้ปัจจัยหลักเป็น น้ำตาลซูโครส และ กรดอะซีติก	120

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ก-4	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของ *A. xylinum* TISTR 107 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาผลของสารอาหารที่เติม	121
ก-5	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญเพื่อสร้างไบโอเซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เมื่อเจริญร่วมกับเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการกลั่นกรองสารอาหาร	122
ก-6	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็น กรด- ด่าง จากการเจริญร่วมกันของเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR107 และ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษาผลของปัจจัยหลักคือ กล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ $(NH_4)_2HPO_4$	123
ข-1	ลักษณะไบโอเซลลูโลสเปียก และลักษณะไบโอเซลลูโลสแห้ง	125
ข-2	ลักษณะการเจริญของไบโอเซลลูโลสที่เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ และอุปกรณ์ที่ใช้เตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น	125
ข-3	เครื่องเขย่าที่ใช้ในการทดลองที่ดัดแปลงให้สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ในช่วง 30 องศาเซลเซียส	125
ข-4	โคโลนีเชื้อ *Acetobacter aceti* subps. *xylinum* TISTR 107 ที่เจริญใน HSA และลักษณะติดสีแกรม	126
ข-5	โคโลนีเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* TISTR 107 ที่เจริญใน YMA และลักษณะการติดสีแกรม	126
ข-6	โคโลนีเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 107 และ *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* TISTR 107 ที่เจริญใน HSA	126
จ-1	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็น กรด- ด่าง จากการเจริญร่วมกันของเชื้อผสมระหว่าง *A. xylinum* TISTR107 และ *K. fragilis* TISTR 5695ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาผลของปัจจัยหลัก คือ กล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 และ *K. fragilis* TISTR 5695	156
จ-2	ปริมาณไบโอเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 107 เพื่อผลิตไบโอเซลลูโลส เมื่อเจริญร่วมกันกับเชื้อ *K. fragilis* TISTR ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาผลการเติมน้ำตาลซูโครส และ $(NH_4)_2HPO_4$	160

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จ-3 ปริมาณไบโอเซลลูโลส ความชื้นของไบโอเซลลูโลส น้ำตาลทั้งหมด การใช้น้ำตาล และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการเจริญและสร้างไบโอเซลลูโลสของ *A. xylinum* TISTR 107 ที่เจริญแบบเชื้อเดี่ยว และเจริญร่วมกับเชื้อ *K. fragilis* TISTR 5695 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 165

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved