ผลของอาหารเสริมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสที่สังเคราะห์โดย *Komagataeibacter nataicola* TISTR 975

The influence of supplements on the production of bacterial cellulose by *Komagataeibacter nataicala* TISTR 975

นางสาวประณัฐดา ไตรวงค์ย้อย

นางสาวภาสินี สงอินทร์

โครงงานทางวัสดุศาสตร์ เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวัสดุศาสตร์

ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2564

ผลของอาหารเสริมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสที่สังเคราะห์โดย *Komagataeibacter nataicola* TISTR 975

The influence of supplements on the production of bacterial cellulose by *Komagataeibacter nataicala* TISTR 975

นางสาวประณัฐดา ไตรวงค์ย้อย

นางสาวภาสินี สงอินทร์

โครงงานทางวัสดุศาสตร์ เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวัสดุศาสตร์

ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2564

ชื่อเรื่อง	**ผลของอาหารเสริมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสที่สังเคราะห์โดย *Komagataeibacter nataicola* TISTR 975** The influence of supplements on the production of bacterial cellulose by *Komagataeibacter nataicola* TISTR 975
ผู้วิจัย	**นางสาวประณัฐดา ไตรวงค์ย้อย** **นางสาวภาสินี สงอินทร์**
อาจารย์ที่ปรึกษา	**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัครินทร์ บุญสมบัติ**
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	**รองศาสตรจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งศุลกะ**

โครงงานทางวัสดุศาสตร์นี้ ให้นับเป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวัสดุศาสตร์

ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัครินทร์ บุญสมบัติ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งศุลกะ)

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยเรื่อง ผลของอาหารเสริมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสที่สังเคราะห์โดย *Komagataeibacter nataicola* TISTR 975 นี้สามารถสำเร็จลุล่วงตามเป้าหมายได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากได้รับความกรุณาในการช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัครินทร์ บุญสมบัติ มาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาสำหรับงานวิจัยนี้ ซึ่งอาจารย์ให้คำปรึกษาได้มีการชี้แนะ ข้อเสนอแนะแนวทางการแก้ไขปัญหาต่างๆ ให้ความรู้ คำแนะนำด้านต่างๆ และพร้อมให้ความช่วยเหลือนิสิตเมื่อประสบกับปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างทำการวิจัย อีกทั้งยังสนับสนุนในทุกด้านเพื่อให้งานวิจัยของผู้วิจัยนั้นมีความสมบูรณ์แบบมากที่สุด คณะผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งใจที่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัครินทร์ บุญสมบัติ เสียสละเวลาอันมีค่ามาเป็นที่ปรึกษาให้ในงานวิจัยนี้ให้ผ่านพ้นไปได้ด้วยดี จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งศุลกะ อาจารย์ภาควิชาจุลชีวะ สาขาวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความกรุณาในการให้ความรู้เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลเซลลูโลส การอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Komagataeibacter nataicola* TISTR 975 และพร้อมให้ความแนะนำด้านต่างๆ ซึ่งผู้ทำวิจัยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูง

ขอกราบขอบคุณอาจารย์ประจำภาควิชาวัสดุศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่คอยให้คำแนะนำและติชม ข้อเสนอแนะต่างๆ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี และสถานที่ในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณอย่างสูง

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณนิสิตชั้นปี 4 ภาควิชาวัสดุศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ค่อยช่วยเหลือทำให้งานวิจัยลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณอย่างสูง

บทคัดย่อ

แบคทีเรียเซลลูโลส (BC) เป็นพอลิเมอร์ที่มีความบริสุทธิ์สูงประกอบด้วยโมเลกุลกลูโคสเพียงอย่างเดียว เนื่องจากปราศจากลิกนิน เพกติน และเฮมิเซลลูโลส อีกทั้งยังมีคุณสมบัติเด่นหลายประการ จึงมีการนำแบคทีเรียลเซลลูโลสไปประยุกต์ใช้ในหลากหลายด้าน เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมการแพทย์ อย่างไรก็ตามผลผลิตของเซลลูโลสจากแบคทีเรียนั้นต่ำมาก ดังนั้นจึงมีการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสเป็นอย่างมาก ในงานนี้ได้มีการศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอาหารเสริม 5 ชนิด ต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Komagataeibacter nataicola* TISTR 975 ซึ่งอาหารเสริมประกอบด้วยกากกาแฟชนิดอาราบิก้าและโรบัสต้า, เอธานอล, PEG 6000 และลิกนิน มีการศึกษารายงานว่าสามารถยกระดับการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้ หลังจากบ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 9 วัน โดยเติมอาหารเสริมแต่ละ 5 ชนิด พบว่าอาหารเสริมทั้งหมดมีอิทธิพลส่งผลต่อผลผลิตเซลลูโลสและการอุ้มน้ำ นอกจากนี้ผลจาก FTIR และ SEM ยังบ่งชี้ว่าคุณภาพของเซลลูโลสเปลี่ยนแปลงไปหลังจากเติมอาหารเสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการวิจัยชี้ว่ากากกาแฟและลิกนินที่ไม่มีคุณค่าสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับแบคทีเรีย ได้เช่นเดียวกันกับอาหารสูตรมาตรฐาน เอธานอล หรือ PEG 6000 เนื่องจากมีสารอาหารที่จำเป็นที่อาจขาดในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปสูตรมาตรฐาน

คำสำคัญ : ลิกนิน, อาหารเสริม, เชื้อแบคทีเรีย *Komagataeibacter nataicola* TITR 975, แบคทีเรียลเซลลูโลส

Abstract

Bacterial cellulose (BC) is a high purity polymer composed of a mere glucose molecule since it lacks lignin, pectin, and hemicellulose. It also has many dominant properties then BC is used in a variety of applications such as the food industry, the pharmaceutical industry, and the medical industry. However, the yield of cellulose from bacteria is tremendously low. Therefore, the enhancement of cellulose production is vastly studied. In this work, the influence of the addition of 5 types of supplements on the production of bacterial cellulose was studied using *Komagataeibacter nataicola* TISTR 975. The supplements composed of Arabica and Robusta spent coffee grounds, ethanol, PEG 6000, and lignin which have previously been reported that they can elevate the production of bacterial cellulose. After incubated at 30 °C for 9 days with the addition of each 5 supplements, it was found that all supplements influence cellulose yield and water holding activity. Moreover, the results from XRD and SEM techniques indicated that the quality of cellulose was altered after the supplements were added to the fermentation medium. The results suggested that unvalued spent coffee ground and lignin can be utilized as a supplement for bacteria like commercial supplements, ethanol, or PEG 6000 since they contained essential nutrition that may be lacking in a common culture medium.

Keywords: Bacterial cellulose, *Komagataeibacter nataicola* TISTR 975, lignin, Supplements, spent coffee ground

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ก

บทคัดย่อภาษาไทย.....ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ค

สารบัญ.....ง

สารบัญตาราง.....ซ

สารบัญรูปภาพ.....ณ

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหางานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์.....2

1.3 ขอบเขตการศึกษา.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

1.5 ระยะเวลาที่ทำวิจัย.....2

1.6 สถานที่ทำงานวิจัย.....3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 Bacterial cellulose.....4

2.2 *Komagataeibacter nataicola* TISTR 975.....4

2.3 การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส....4

2.3.1 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย....4

2.4 กาแฟ....5

2.4.1 กากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า....5

2.4.2 กากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า....5

2.4.3 ลักษณะของกาแฟ....5

2.4.4 กากกาแฟ (spent coffee ground)....6

2.5 ลิกนิน (Lignin)....6

2.6 โพลิเอทิลีนไกลคอล (PEG)....7

2.7 เอทานอล....8

2.8 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์....9

2.8.1 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์....10

2.8.2 การแบ่งชนิดตามลักษณะการเตรียมของอาหารเลี้ยงเชื้อ....10

2.9 การทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilization)....11

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน....12

3.1 สารเคมีและวัตถุดิบ....12

3.2 เครื่องมือ....12

3.3 อุปกรณ์อื่น....13

3.4 วิธีดำเนินงาน....14

3.4.1 เชื้อแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975....14

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตราฐาน....14

3.4.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน....14

3.4.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975....14

3.4.5 การเตรียมอาหารเสริม....15

3.4.6 การลงเชื้อ *K. nataicola* TISTR 975....16

3.4.7 การทำแบคทีเรียเซลลูโลสให้บริสุทธิ์....17

3.4.8 การอุ้มน้ำแบคทีเรียลเซลลูโลส....17

3.4.9 การศึกษาค่าความชุ่มชื้น....18

3.4.10 การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลส....19

3.4.11 การหาปริมาณน้ำตาล....20

บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัยและการอภิปราย....21

4.1 ผลของการกล้าเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975 ที่สภาวะแตกต่างกัน.21

4.2 ผลของการบ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975....22

4.3 ผลศึกษาค่าความชุ่มชื้น....24

4.4 ผลศึกษาการอุ้มน้ำ....26

4.5 การศึกษาลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลส....26

4.5.1 การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด....26

4.5.2 การวิเคราะห์ด้วยอินฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์....28

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ....30

เอกสารอ้างอิง....31

ภาคผนวก.....34

ประวัติผู้วิจัย.....37

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตารางการทดสอบความชุ่มชื้น.....25

ตารางที่ 2 Lateral order index (LOI).....29

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 2.1 โครงสร้างลิกนิน....7

ภาพประกอบ 2.2 โครงสร้างของโพลิเอทิลีนไกลคอล....8

ภาพประกอบ 2.3 โครงสร้างของเอทานอล....9

ภาพประกอบ 3.1 แบคทีเรียเซลลูโลสหลังจากนำไปตีด้วยความเร็ว 190 รอบต่อนาที....15

ภาพประกอบ 3.2 การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่อง auto clave....16

ภาพประกอบ 3.3 วันแรกของการลงเชื้อแบคทีเรีย *K. nataicola* TSTIR 975....16

ภาพประกอบ 3.4 การนำแบคทีเรียลเซลลูโลสเข้าอบ....17

ภาพประกอบ 3.5 การแช่แบคทีเรียลเซลลูโลสในน้ำกลั่น....17

ภาพประกอบ 3.6 แผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสหลังจากอบแห้งแช่ใน propylene glycol และ hyaluronate extract....18

ภาพประกอบ 3.7 การทดสอบความชุ่มชื้นบนผิวหนัง....19

ภาพประกอบ 4.1 (a) แบคทีเรียลเซลลูโลสที่ฟอร์มตัวขึ้นในสภาวะแบบนิ่ง (b) แบคทีเรียลเซลลูโลสที่ฟอร์มตัวขึ้นหลังจากเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที....21

ภาพประกอบ 4.2 วันสุดท้ายของการเก็บผลผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *K. nataicala* TISTR 975 (a) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน (b) ลิกนิน (c) เอทานอล (d) PEG6000 (e) arabica และ (f) robusta....22

ภาพประกอบ 4.3 ปริมาณการใช้น้ำตาลของอาหารเสริมทั้ง 5 ชนิด....23

ภาพประกอบ 4.4 การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส....23

ภาพประกอบ 4.5 ความหนาของแบคทีเรียลเซลลูโลส.....24

ภาพประกอบ 4.6 ความชุ่มชื้นในสภาวะต่างๆโดยใช้แบคทีเรียลเซลลูโลสเป็นแผ่นมาส์ก.....25

ภาพประกอบ 4.7 water holding capacity.....26

ภาพประกอบ 4.8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *K. nataicala* TISTR 975 ด้วยการเติมอาหารเสริม (a) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน (b) ลิกนิน (c) เอทานอล (d) PEG6000 (e)arabica (f) robusta ภายใต้การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 70,000 เท่า.....27

ภาพประกอบ 4.9 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared spectroscopy,FT-IR) ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่มีการเติมอาหารเสริม.....28

ภาพประกอบ 4.10 แสดงหมู่ฟังก์ชั่นทางเคมีของแบคทีเรียลเซลลูโลส.....29

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหางานวิจัย

แบคทีเรียลเซลลูโลส (Bacterial cellulose ; BC) เป็นสารชีวโมเลกุลประเภทคาร์โบไฮเดตที่ผลิตจากแบคทีเรีย มีโครงสร้างประกอบด้วยพอลิเมอร์ขนาดเล็กที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิติกชนิดบีตา[22] เซลลูโลสที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูงเนื่องจากปราศจากลิกนินและเฮมิเซลลูโลส โดยสายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส ได้แก่ *Acetobacter xylinum* ซึ่งจัดอยู่ในสกุล Acetobacter เป็นแบคทีเรียแกรมลบมีรูปร่างเป็นรูปไข่และรูปแท่ง อยู่เป็นทั้งเซลล์เดี่ยวและเซลล์คู่หรือเรียงต่อกันเป็นสาย ต้องการอากาศในการเจริญเติบโตสามารถผลิตกรดอะซิติก (acetic acid) สามารถเจริญได้ดีที่สภาวะอุณหภูมิ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส ที่ค่า pH เท่ากับ 3 ถึง 7 ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตเป็นแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์เซลลูโลสออกมาภายนอกเซลล์[19] และปริมาณการผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum* นั้นมีปริมาณมากกว่าและระยะเวลาในการหมักที่เวลาน้อยกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น[4] โดย *Komagataeibacter nataicola* TISTR 2661 จัดเป็นแบคทีเรียสกุล Acetobacter เช่นเดียวกันและในไทยยังไม่มีผลของการศึกษาแบคทีเรียชนิดนี้อย่างกว้างขวาง

ปัจจุบันแบคทีเรียลเซลลูโลสถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางเนื่องจากสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้หลากหลายในด้านต่างๆ เช่น ด้านอุตสาหกรรม ด้านการแพทย์ ด้านชีววิทยา และด้านการบริโภค[22] เป็นต้น เนื่องจากมีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและเคมีที่โดดเด่นรวมถึงความเสถียรทางความร้อนสูง ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่าย มีความสามารถในการกักเก็บน้ำที่ดี[31] อุ้มน้ำได้มาก มีความแข็งแรง ความเป็นผลึกและความบริสุทธิ์สูงเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากพืช ถึงแม้ว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสจะมีข้อดีที่มากกว่าแบคทีเรียลที่มาจากพืชแต่กระบวนการการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสนั้นมีข้อจำกัดในด้านต้นทุนอาหารเพาะเลี้ยง เช่น Glucose, Peptone, Yeast extract, Citric acid มีราคาสูงและอัตราการผลิตที่ได้ค่อนข้างต่ำ[31] ซึ่งไม่เพียงพอต่อความต้องการจำนวนมาก จะเห็นได้ว่าการที่จะผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ดีและมีปริมาณสูงต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่าง เช่น แหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ปริมาณออกซิเจน ค่า pH ระดับอุณหภูมิ[21] และอาหารเสริม เป็นต้น ซึ่งอาหารเสริมเป็นวิธีทางเลือกที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสให้ได้ปริมาณสูงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียลเซลลูโลส

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของการเพิ่มอาหารเสริมในแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975 นอกเหนือจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสเพียงอย่างเดียว โดยอาหารเสริมที่เลือกใช้ในงานวิจัยได้แก่ กากกาแฟชนิด อาราบิก้า และ โรบัสต้า เอทานอล PEG 6000 และ ลิกนิน ซึ่งเป็นอาหารเสริมที่ได้มีงานวิจัยก่อนหน้ารายงานว่าสามารถเพิ่มผลผลิตของ แบคทีเรียลเซลลูโลสในกลุ่ม Acetobacter ได้ รวมถึงเป็นอาหารเสริมที่สามารถหาได้ง่าย ราคาถูก และยังไม่มีการศึกษาผลต่อ *K. nataicola* TISTR 975

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการผลของการเพิ่มอาหารเสริมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย *K. nataicola* TISTR 975
2. เพื่อศึกษาสมบัติการอุ้มน้ำ (Water holding capacity, WHC) และคุณลักษณะทางกายภาพ รวมถึงคุณลักษณะทางเคมีของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ได้จาก *K. nataicola* TISTR 975

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1. อาหารเสริมที่ใช้เติมลงในสูตรอาหารมาตรฐานที่ทำการศึกษา คือ กากกาแฟชนิด อาราบิก้าและ โรบัสต้า เอทานอล PEG 6000 และ ลิกนิน
2. สมบัติการอุ้มน้ำสามารถคำนวณได้จากความสามารถในการกักเก็บน้ำของแบคทีเรียลเซลลูโลส สำหรับคุณลักษณะทางกายภาพตรวจสอบด้วย SEM และคุณลักษณะทางเคมีตรวจสอบด้วย FT-IR

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถทราบถึงผลของการศึกษาการใส่อาหารเสริมทั้ง 5 ชนิด ว่าอาหารเสริมตัวใดดีที่สุดในการสังเคราะห์เพื่อผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส
2. สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์
3. สามารถทราบถึงประสิทธิภาพในการอุ้มกักเก็บน้ำของแบคทีเรียลเซลลูโลส

1.5 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

มกราคม 2565 - พฤษาคม 2565

1.6 สถานที่ทำงานวิจัย

ห้องปฏิบัติภาควัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทที่2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Bacterial cellulose

แบคทีเรียลเซลลูโลสเป็นสารชีวโมเลกุลประเภท Carbohydrate ชนิด Homopolysaccharide แบบเชิงเส้นมีลักษณะเป็นโฮโมพอลิเมอร์ที่ไม่มีกิ่งก้าน (unbranched) “ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา ไกลโคซิดิก ผลิตได้จากแบคทีเรียบางสายพันธุ์”[14]

2.2 *Komagataeibacter nataicola* TISTR 975

แบคทีเรีย *Komagataeibacter nataicola* เป็นสปีชีส์ที่มีชื่อเดิมว่า *Gluconacetobacter* ซึ่ง เป็นสกุลของแบคทีเรียในวงศ์ *Acetobacteraceae*[8] โดย *Komagataeibacter* นั้นเป็นแบคทีเรียกรดอะซิติก (Acetic Acid bacteria) มีลักษณะเป็นแท่งแกรมลบ[19] ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตช่วงสภาวะของค่า pH ที่มีความเหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียกรดอะซิติกอยู่ที่ 5.0 - 6.5 แต่สามารถเจริญได้ในที่ที่ค่า pH ต่ำที่ 3.0–4.0[6] ซึ่ง *Komagataeibacter* นั้นสามารถผลิตเซลลูโลสได้และทนต่อกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้นสูง

2.3 การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส

2.3.1 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียมีดังต่อไปนี้

1. แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศใช้แหล่งคาร์บอน 50-55 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ ซึ่งในการผลิตแบคทีเรียเซลล์ลูโลสโดยทั่วไปใช้กลูโคสหรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต[33]

2. แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนและในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งในเซลล์ของแบคทีเรียมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ และความต้องการไนโตรเจนของแบคทีเรียแต่

ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีสารไนโตรเจนอนินทรีย์แต่บางสายพันธุ์ต้องการสารไนโตรเจนอินทรีย์[33]

3. พีเอช

พีเอชของอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์และยังส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสารอาหารรวมถึงการให้อาหารผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ได้[26]

4. อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อทั้งการเจริญของแบคทีเรียและการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส พบว่าอุณหภูมิในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้สูงที่สุด[20]

2.4 กาแฟ

กาแฟ คือพืชที่อยู่ในตระกูล Rubiaceae สายพันธุ์ Coffea มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *coffea Arabica L.* ซึ่งกาแฟจะจัดเป็นไม้พุ่มมีแหล่งกำเนิดอยู่ในเขตร้อนและกึ่งร้อนของทวีปแอฟริกา[12]ซึ่งกาแฟในปัจจุบันจะนิยมปลูกอยู่ 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์อาราบิก้า และสายพันธุ์โรบัสต้า[13]

2.4.1 กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า (coffee arabica)

เป็นสายพันธุ์ที่นิยมมากที่สุด มีลักษณะเด่นที่กลิ่นและรสที่หอม มีคาเฟอีนประมาณ 1-1.6 เปอร์เซ็นต่อเมล็ด มักจะไม่ทนต่อโรคและสภาพอากาศ[7] ซึ่งในประเทศไทยนิยมปลูกมากในจังหวัดทางภาคเหนือ

2.4.2 กาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า (Robusta-coffee canephora)

เป็นพันธุ์ที่ทนต่อโรค และมีรสชาติกระด้าง ไม่อ่อนละมุนเหมือนอาราบิก้า มีคาเฟอีนที่สูงประมาณ 2-3 เปอร์เซ็นต์ต่อเมล็ด สามารถปลูกได้ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับเหนือน้ำทะเล 2000 ฟุต[7] ซึ่งในประเทศไทยนิยมปลูกในภาคใต้

2.4.3 ลักษณะของกาแฟประกอบด้วย 3 ส่วนดังนี้

ลำต้น มีลักษณะลำต้นตรงในระยะแรกของการเจริญเติบโตจะไม่แตกกิ่งแต่มีใบแตกออกตรงข้อ พอการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆจะมีกิ่งแตกออกจากลำต้นในลักษณะแยกออกจากกัน[1]

ดอก มีสีขาวบริสุทธิ์ กลิ่นหอมคล้ายมะลิป่า รูปคล้ายดาว มีก้านที่สั้นอยู่รวมกันเป็นกลุ่มจะเกิดตามข้อของต้นกาแฟ[1]

ผล มีลักษณะคล้ายลูกหว้า ซึ่งภายในผลกาแฟจะมีลักษณะแบนยาวตามรูปของเปลือกหุ้ม เมล็ดที่เหลืออยู่จะมีรูปกลม ส่วนยาวจะมีรูปโค้งเป็นรูปกระบอกตัด

2.4.4 กากกาแฟ (spent coffee ground)

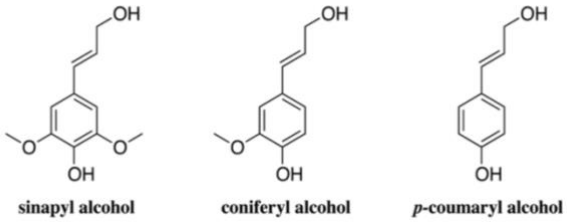
กากกาแฟ คือกากกาแฟจัดเป็นสารอินทรีย์ที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการแปรรูปที่สกัดน้ำกาแฟ ซึ่งกากกาแฟเป็นกากของเสียที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และในกากกาแฟจะประกอบไปด้วย โพลิแซคคาไรด์ กรดไขมัน โปรตีน คาเฟอีน สารประกรอบฟีนอล และแร่ธาตุต่างๆ[9] พอลีแซ็คคาไรด์ จะพบได้ว่าปริมาณของ กาแล็กโทส และแมนโทสสูงถึง 74% และ 66% w/w[16] และเมื่อสกัดอย่างต่อเนื่อง พบว่า ปริมาณเซลลูโลสมีมากถึง 84% [16], โปรตีน ในกากกาแฟจะมีปริมาณโดยเฉลี่ยที่ 13.6% w/w[27] , ไขมัน ในกากกาแฟจะมีปริมาณอยู่ที่ช่วง 11-20 % w/w แต่โดยเฉลี่ยจะอยู่ที่ 15% w/w[29] สารประกอบฟีนอล ซึ่งในกากกาแฟจะพบสารประกอบฟีนอลอยู่ประมาณร้อยละ 1-4% GAE w/w [17] คาเฟอีนจะพบในกากกาแฟปริมาณคาแฟอีนเหลืออยู่ในช่วง 0.73 - 41.3 ug/mg[30] และแร่ธาตุที่พบในกากกาแฟจะประกอบไปด้วย K, P, Mg, Ca, Al, Fe, Mn, Cu, Zn, S, และ Cr[27]

ในการศึกษางานวิจัยของ Karina Carvalho de Souza และคณะ, (2021) พบว่าการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Komagataeibacter Rhaeticus* มาบ่มเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลาทั้งหมด 240 ชั่วโมง เพื่อให้ได้แบคทีเรียลเซลลูโลสนั้นสามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้เป็นอย่างดี อีกทั้งการผสมอาหารเสริมซึ่งได้แก่ กากกาแฟ กากน้ำตาลอ้อยที่ผ่านการไฮโดรไลซิส และการเติมเอทานอล ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นสามารถให้ผลผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสดีและสูงที่สุด โดยจะให้ผลผลิตอยู่ที่ 11.08 กรัมต่อลิตร อีกทั้งยังพบว่าน้ำตาลมีส่วนในการเพิ่มผลผลิตเซลลูโลส และกากกาแฟก็สามารถเพิ่มผลผลิตเซลลูโลสได้เช่นเดียวกันเนื่องจากกากกาแฟนั้นประกอบไปด้วย พอลิแซ็คคาไรด์ น้ำมัน และโปรตีน ที่มีอิทธิพลส่งผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส[23]

2.5 ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่มีรูปผลึก ไม่ละลายน้ำ ส่วนใหญ่มักพบในผนังเซลล์ของพืช ช่วยให้พืชมีความแข็งแรงและป้องกันโครงสร้างภายในพืชไม่ให้ถูกจุลินทรีย์ทำลาย โดยจะมีโครงสร้างซึ่งเกิดจากองค์ประกอบหลักที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ เรียกว่า มอนอลิกนอล (Monolignols) หรือ ฟีนิลโพรเพน (Phenylpropane, C6-C3

units) ซึ่งหน่วยโครงสร้างดังกล่าวจะเป็นวงอะโรมาติก แอลกอฮอล์ที่ชื่อว่า Sinapyl alcohol (Syringyl, S) p-Coumaryl alcohol (4-Hydroxyl phenyl, H), และ Coniferyl alcohol (Guaiacyl, G)[10]

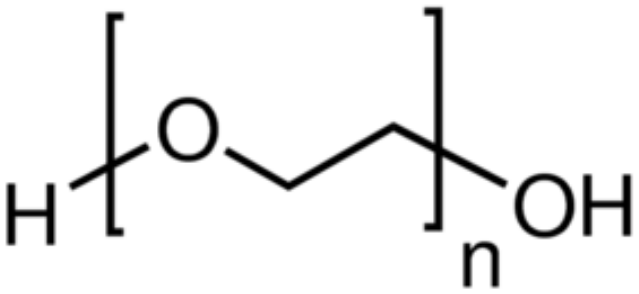


ภาพประกอบ 2.1 : โครงสร้างลิกนิน

ลิกนินเป็นสารประกอบระหว่างคาร์บอน โฮโดรเจน และออกซิเจน รวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิดจนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนมีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีสมบัติไม่ละลายน้ำ ไม่ยืดหยุ่น มีความแข็งแรงทนทานสูง[10] สำหรับหน่วยย่อยของลิกนิน (Monolignols) จะมีโครงสร้างแบบอะโรมาติกและมักพบได้ในธรรมชาติ ทั้งหมด 3 มอนอเมอร์ ได้แก่ p-Coumaryl alcohol พบมากในพืชตระกูลหญ้า ส่วน Coniferyl alcohol จะพบมากในพืชใบแคบ (Softwood) ประมาณ 26-32 เปอร์เซ็นต์ และพืชใบกว้าง (Hardwood) ประมาณ 20-28 เปอร์เซ็นต์ และ Sinapyl alcohols จะพบมากในพืชใบกว้าง[10] จากการศึกษาของ K.Aswini และคณะ, (2020) แสดงให้เห็นว่าการเติมลิกนิน 1% ปริมาตรต่อปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นสามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้ดีและมีปริมาณเซลลูโลสมากถึง 67 มิลลิกรัม[24]

2.6 โพลิเอทิลีนไกลคอล (PEG)

โพลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) มีลักษณะเป็นเกล็ดสีขาวเป็นพอลิเมอร์ของเอทิลีนออกไซด์และน้ำ ซึ่งได้มาจากการควบแน่น มีความอ่อนไหวต่อการเสื่อมสภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในที่ที่มีอากาศ การลดการสัมผัสโพลิเอทิลันไกลคอลในอุณหภูมิสูงหรือการสัมผัสกับออกซิเจนหรือการเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระสามารถจำกัดปริมาณการย่อยสลายได้ โพลิเอทิลีนไกลคอลไม่เกิดการไฮโดรไลซ์หรือเสื่อมสภาพ อีกทั้งยังเป็นสารที่ใช้ในผงซักฟอก สารทำอิมัลชัน สบู่ การเตรียมยา และเครื่องสำอางมักใช้โพลิเอทิลีนไกลคอลเป็นสารหล่อลื่น[28]

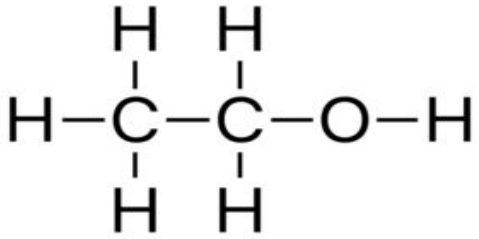


ภาพประกอบ 2.2. : โครงสร้างของโพลิเอทิลีนไกลคอล

ในงานวิจัยของ K. Aswini และคณะ, (2020). ได้ทำการศึกษาการปรับสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส ซึ่งในงานวิจัยได้ทำการเติม PEG 6000 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน โดยใช้ PEG 6000 ที่ปริมาตร 7.76 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่าปรับสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานด้วยการเติม PEG 6000 ส่งผลทำให้เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter senegalensis* MA1 สามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสเพิ่มสูงขึ้นกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตราฐานที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพถึงประมาณ 20 เท่า อีกทั้งแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้ยังมีน้ำหนักมากถึง 469.83 กรัมต่อลิตร[24] อีกทั้งจากการงานวิจัยของ Haifang Liu และคณะ, (2012) พบว่าการเติม PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *A.xylinum* HN001 ในการผลิตเซลลูโลสนั้นได้ส่งผลต่อลักษณะสัณฐานวิทยาแบคทีเรียลเซลลูโลสซึ่งจะทำให้ขนาดรูพรุนคอมโพสิตเซลลูโลส-โพลีเอทิลีนไกลคอล (BC-PEG) มีขนาดแตกต่างกันและมีขนาดใหญ่เพิ่มขึ้นอีกด้วย[18]

2.7 เอทานอล

เอทานอล (ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งมีสมบัติติดไฟง่าย มีลักษณะเป็นของเหลว และมีสีใส ซึ่งเอทานอลเกิดจากการหมักพืชเพื่อเปลี่ยนแป้งจากพืชเป็นน้ำตาลแล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์เมื่อทำให้เป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการกลั่นจะเรียกว่าเอทานอล (Ethanol)[2] ซึ่งเอทานอลเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจำพวกแอลกอฮอล์และเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบไปด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน สามารถละลายทั้งในน้ำและละลายในสารละลายอินทรีย์อื่นๆ ได้[2]



ภาพประกอบ 2.3 : โครงสร้างของเอทานอล

ในงานวิจัยของ Karina Carvalho de Souza และคณะ, (2021). ได้ศึกษาการเติมอาหารเสริมเอทานอลที่ความเข้มข้น 1.0% ปริมาตรต่อปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานนั้นสามารถเป็นแหล่งพลังงานในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ของเซลล์ที่เป็นสารตั้งต้น ได้แก่ การสร้าง adenosine triphosphate (ATP) และ glucose 6-phosphate (G6P) ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการผลิตเซลลูโลสของแบคทีเรีย โดยใช้เวลาในการผลิตเซลลูโลสทั้งหมดเป็นเวลา 240 ชั่วโมง[23] สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhigang Lu และคณะ (2011). ที่ได้ทำการศึกษาผลของแอลกอฮอล์ทั้ง 6 ชนิด ที่ส่งผลต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส พบว่าการเติมแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันสามารถเป็นปัจจัยในการกระตุ้นการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส โดยอัตราการผลิตเซลลูโลสของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นตามอัตราการเติบโตของแบคทีเรียซึ่งเป็นไปในทางทิศเดียวกัน[35] และยังมีงานวิจัยของ Suneit และคณะ, (2000). ที่ได้ทำการศึกษาพบว่าแอลกอฮอล์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตจุลินทรีย์ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนโดยแบคทีเรียยังสร้างชั้นวุ้นได้ตามปกติ[34]

2.8 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อ หมายถึง อาหารที่มีส่วนประกอบของสารอาหารที่สำคัญสามารถเอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนขึ้นของจุลินทรีย์[3] โดยการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และความต้องการของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 3 แบบ ได้แก่ อาหารเหลว (Broth media) อาหารแข็ง (solid media) และอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) เป็นต้น ปัจจุบันอาหารเลี้ยงเชื้อถูกพัฒนาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปซึ่งเป็นสารเคมีบริสุทธิ์สามารถนำไปใช้งานโดยการผสมน้ำกลั่นและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อได้เลย และยัง

มีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตจากวัตถุดิบที่มาจากธรรมชาติมาใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ ซึ่งประสิทธิภาพในการเลี้ยงเชื้อนั้นไม่ได้แตกต่างกันกับอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปอีกทั้งยังมีข้อดีคือราคาถูกกว่า[11]

2.8.1 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

การเลี้ยงเชื้อจุลิทรีย์นั้นควรคำนึงถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้

1. ชนิดและความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จะต้องมีธาตุอาหารและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ธาตุอาหารนั้นได้มาจากแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งพลังงาน เกลือแร่ และวิตามิน[11]

2. อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์จะมีช่วงอุณหภูมิในการเจริญเติบที่แตกต่างกัน การใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมจะส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดี

3. ค่าพีเอช

ค่าพีเอชนั้นส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีช่วงค่าพีเอชในการเจริญเติบโตได้ดีที่แตกต่างกัน ในแต่ครั้งจึงต้องมีการวัดค่าพีเอชก่อนใช้งานทุกครั้ง

2.8.2 การแบ่งชนิดตามลักษณะการเตรียมของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Common Ingredient of culture Media

เป็นการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการชั่งสารที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ตามสูตรจากนั้นจึงค่อยนำไปละลายในน้ำกลั่น การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบนี้จะใช้เวลานานกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปและต้องชั่งให้ได้ตามสูตร แต่มีข้อดีคือสามารถเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อได้หลายหลายชนิดและยังราคาถูก

2. Dehydrated Media

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่ผ่านการชั่งและผสมสารที่บริสุทธิ์มาเรียบร้อยแล้ว ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้โดยการคำนวณปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องใช้แล้วนำไปละลายในน้ำกลั่น การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรูปแบบนี้จะให้ความสะดวก ความรวดเร็วในการใช้งาน แต่มีข้อเสียคือราคาแพง

2.9 การทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilization)

การทำให้ปราศจากเชื้อ หมายถึง กระบวนการกำจัดหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์รวมถึงสปอร์ทุกชนิดไม่ให้มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียเกิดขึ้น สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีทางกายภาพและการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีทางเคมี[5] ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้มีการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการ autoclave

1. การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีทางกายภาพ (physical means)

1. Autoclave หรือ pressure cooker หม้อนึ่งความดันไอน้ำเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ฆ่าเชื้อโดยทำงานภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง[25]ใช้เพื่อกำจัดเชื้อที่อาจปนเปื้อนก่อนหรือหลังการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งควรนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อทุกครั้งก่อนนำไปใช้งาน โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

2. Dry heat เป็นการอบร้อนเพื่อกำจัดจุลินทรีย์โดยใช้ตู้อบ ซึ่งในตู้อบจะใช้อุณหภูมิสูงถึง 180 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง เหมาะกับการกำจัดจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมากับวัสดุอุปกรณ์เครื่องแก้วที่สามารถทนความร้อนสูง[3]

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและวัตถุดิบ

1. แบคทีเรีย *Komagataeibacter nataicola* TISTR 975
2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน Hestrin-Schramm (HS) ประกอบด้วย
    i. Glucose 20 กรัมต่อลิตร
    ii. Peptone 5 กรัมต่อลิตร
    iii. Yeast Extract 5 กรัมต่อลิตร
    iv. Na_2HPO_4 2.7 กรัมต่อลิตร
    v. Citric acid 1.5 กรัมต่อลิตร
3. อาหารเสริม ได้แก่

    i. กากกาแฟชนิด อาราบิก้า และ โรบัสต้า 0.24 กรัม
    ii. เอทานอล 0.03 กรัม
    iii. PEG 6000 0.23 กรัม
    iv. ลิกนิน 0.03 กรัม

4. น้ำกลั่น

3.2 เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM)
2. เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์ (Fourier transform infrared spectrometer; FTIR)
3. เครื่องสเปคโครโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น Genesys 10S UV-VIS ,Thermo Scientific
4. เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo) รุ่น Analytical Balance

5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (Bench pH Meter) รุ่น 3510, Jenway
6. เครื่องวัดค่าความชุ่มชื้น
7. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
8. เครื่องอบลมร้อน (Hot Air Oven Binder) รุ่น ED Series, Mit Service Hotline
9. อ่างน้ำควบคุมอุณภูมิ (Waterbath Shaker)
10. ตู้ดูดความชื้น (Dry keeper sanplatec corp)
11. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
12. เครื่องผสมสาร (Vortex)
13. เครื่องตีบดผสม (Stomacher) รุ่น Stomacher 400 Circulator, Seward
14. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hotplate stirrer)

3.3 อุปกรณ์อื่น

1. ขวดรูปชมพู่ 100 มิลลิลิตร (conical flask)
2. แผ่นฟอยล์อลูมิเนียม
3. หลอดทดลอง
4. ถ้วยระเหย
5. ขวดฉีดน้ำกลั่น
6. ถุงนม
7. คีมคีบ
8. ขวดใส่สารละลาย
9. ถ้วยตวง
10. แท่งแก้ว
11. บีกเกอร์
12. ปิเปตต์
13. หัวทิป

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.4.1 เชื้อแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยคือ *Komagataeibacter nataicola* TISTR 975 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ซึ่งมาในสภาพ Freeze dry โดยเชื้อแบคทีเรียถูกนำมาเลี้ยงในอาหารวุ้นตามสูตรอาหารที่แนะนำจากวว. และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการศึกษาในงานวิจัย

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน Hestrin-Schramm (HS)

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน Hestrin-Schramm (HS) ประกอบไปด้วย Glucose 20 g/l, Peptone 4 g/l, Yeast Extract 5 g/l, Na_2HPO_4 2.7 g/l, Citric acid 1.5 g/l

3.4.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน Hestrin-Schramm (HS)

ชั่งส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรมาตรฐาน แล้วนำสารทั้งหมดไปละลายในน้ำกลั่นที่มีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปฆ่าเชื้อโดยการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (auto clave) ซึ่งใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที[3] หลังจากนั้นรอให้หม้อนึ่งลดความดันและอุณหภูมิลงที่ 80-100 องศาเซลเซียส จึงสามารถนำอาหารเลี้ยงเชื้อออกมาได้ พักไว้ให้เย็นตัวลงแล้วค่อยนำไปใช้งานต่อไป

3.4.4 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975

นำเชื้อแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975 จากหลอดทดลองที่มี slant เป็นของแข็ง 1 มิลลิลิตร มาลงใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ซึ่งรวมทั้งหมดเป็น 10 มิลลิลิตร และนำไปบ่ม 1-2 วัน เมื่อครบกำหนดจึงนำเอาหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปถ่ายโอนลงในขวดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 90 ml และนำไปบ่มต่อ 2-3 วัน โดยใช้อุณหภูมิในการบ่ม 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เมื่อบ่มครบกำหนดจะสังเกตเห็นได้ว่ามีแผ่นเซลลูโลสฟอร์มขึ้นมาเป็นก้อนกลม แล้วจึงนำมาใส่ถุงนมที่ผ่านการสเตอร์ไรด์ (sterile) และนำไปตีเชื้อเพื่อให้ตัวแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ฟอร์มขึ้นมานั้นแตกตัวผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน โดยจะนำไปตีด้วยความเร็ว 190 รอบต่อนาที

ภาพประกอบ 3.1 : แบคทีเรียลเซลลูโลสหลังจากนำไปตีด้วยความเร็ว 190 รอบต่อนาที

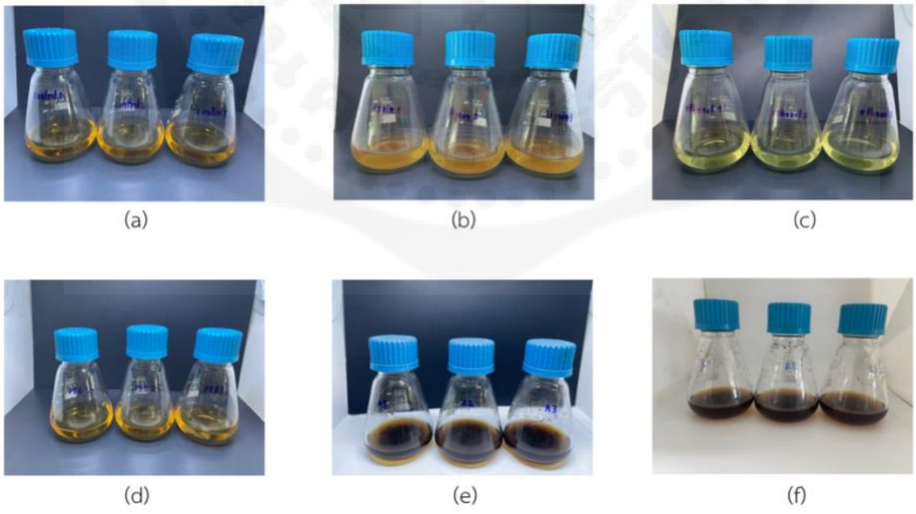
3.4.5 การเตรียมอาหารเสริมทั้ง 5 ชนิด

ในงานวิจัยจะทำการเติมอาหารเสริมทั้ง 5 ชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน ซึ่งอาหารเสริมจะได้แก่ กากกาแฟ 2 สายพันธุ์ คือ อาราบิก้า และ โรบัสต้า, เอทานอล, PEG 6000 และลิกนิน โดยจะใช้กากกาแฟอาราบิก้า และ โรบัสต้า ปริมาณอย่างละ 8 กรัมต่อลิตร[23]เอทานอลที่มีความเข้มข้น 1% ปริมาตรต่อปริมาตร[23] PEG 6000 ปริมาณ 7.76 กรัมต่อลิตร[24] และลิกนินความเข้มข้น 1% ปริมาตรต่อปริมาตร[24] โดยค่าความเข้มข้นของอาหารเสริมแต่ละชนิดเป็นค่าที่ได้มาจากการศึกษาในแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้ ซึ่งแบคทีเรียอยู่ในสกุลที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้ ซึ่งตอนแรกจะทำการนำอาหารเสริมมาชั่งให้ได้ปริมาณตามที่กล่าวข้างต้น โดยใช้กากกาแฟ อาราบิก้า และ โรบัสต้า ที่ผ่านการอบแห้ง 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ปริมาณ 0.24 กรัม, เอทานอล 0.03 กรัม, PEG 6000 0.23 กรัม และลิกนิน 0.03 กรัม ตามลำดับ จากนั้นจึงนำมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน ปริมาตร 27 มิลลิลิตร ซึ่งทุกการทดลองอาหารเสริมแต่ละชนิดจะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และใช้ตัวควบคุม (control) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานทุกครั้ง จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในเครื่อง Auto clave โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาพประกอบ 3.2 : การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่อง auto clave

3.4.6 การลงเชื้อ *K. nataicola* TISTR 975 ในอาหารเสริมเพื่อใช้ในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส

นำเชื้อแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975 โดยทำการดูดเชื้อด้วยไมโครปิเปตขึ้นมา 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปเติมใส่ในขวดทดลองแต่ละขวดที่มีอาหารเสริมและอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานผสมเข้าด้วยกันซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อมาเรียบร้อย จากนั้นนำไปบ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียลเซลลูโลสที่อ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 9 วัน โดยใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส[15]



ภาพประกอบ 3.3 : วันแรกของการลงเชื้อแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975 : (a) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน (b) ลิกนิน (c) เอทานอล และ (d) PEG6000 (e) อาราบิก้า และ (f) โรบัสต้า

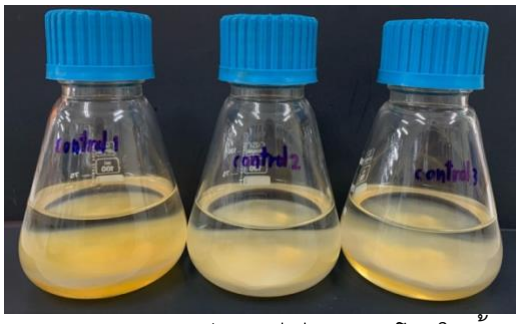
3.4.7 การทำแบคทีเรียลเซลลูโลสให้บริสุทธิ์

สามารถทำได้โดยการนำแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้มากรองและล้างด้วยน้ำกลั่น จำนวน 3 ครั้ง เมื่อล้างน้ำกลั่นเสร็จเรียบร้อยแล้วจึงนำแบคทีเรียลเซลลูโลสมาล้างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ขวดละ 60 มิลลิลิตร และนำไปแช่ที่อ่างควบคุมอุณภูมิเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งขั้นตอนนี้จะขจัดด่างและสิ่งสกปรกที่อาจตกค้างอยู่บนแบคทีเรียลเซลลูโลสเพื่อให้ได้แบคทีเรียลเซลลูโลสที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำมาล้างต่อด้วยน้ำกลั่นให้สะอาดจนกระทั่งมีค่า pH ใกล้เคียงกับน้ำกลั่น คือ pH 7.7 เมื่อล้างเสร็จแล้วจึงนำแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสใส่ในถ้วยระเหยที่มีฟอยล์หุ้มอยู่และนำเข้าตู้อบเพื่อทำให้แห้งโดยใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง[15] จนน้ำหนักของแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสคงที่และนำมาชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบกัน จากนั้นนำผลที่ได้มาทำการวิเคราะห์

ภาพประกอบ 3.4 : การนำแบคทีเรียลเซลลูโลสเข้าอบ

3.4.8 การอุ้มน้ำแบคทีเรียลเซลลูโลส (Water holding capacity ; WHC)

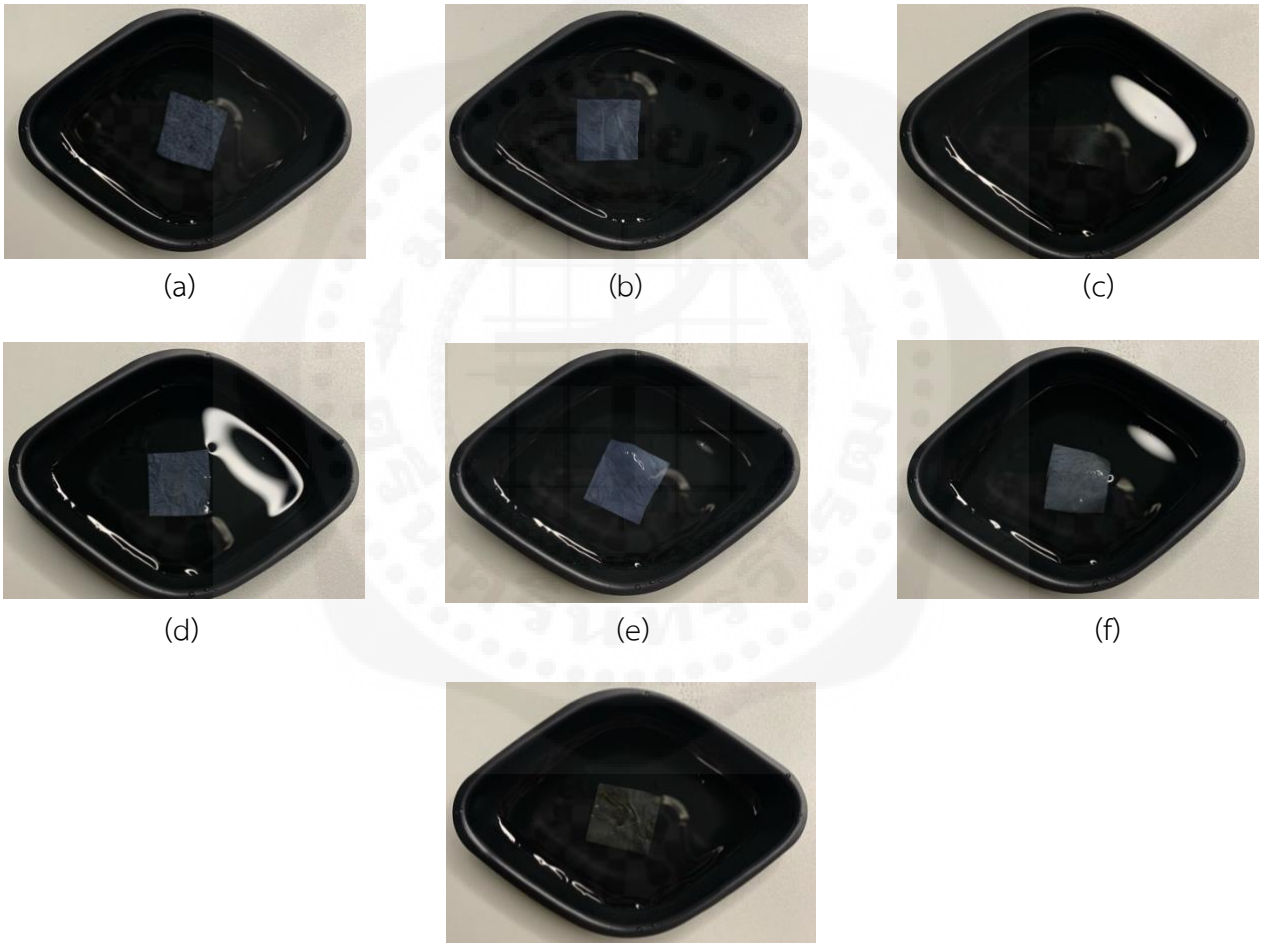
นำแบคทีเรียลเซลลูโลสแช่น้ำกลั่นทิ้งไว้เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงคีบแบคทีเรียลเซลลูโลสขึ้นมาและสะบัดเพื่อนำน้ำออก 2 ครั้ง (shake method) จากนั้นนำมาชั่งและทำการบันทึกค่าน้ำหนัก



ภาพประกอบ 3.5 : แช่แบคทีเรียลเซลลูโลสในน้ำกลั่น

3.4.9 การศึกษาค่าความชุ่มชื้น (Fabricate Skin mask)

ทำการเตรียมสาร propylene glycol และ hyaluronate extract ในสัดส่วน 95 (v/v%) และ 5 (v/v%) ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างมาตัดให้ได้ขนาด 1.5×1.5 เซนติเมตร ซึ่งตัวอย่างได้แก่ แผ่นชีทมาส์ก, แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ, ลิกนิน, เอทานอล, PEG6000, กากกาแฟอาราบิก้า และ โรบัสต้า เป็นต้น นำตัวอย่างทั้งหมดที่ตัดแล้วไปแช่ใน propylene glycol ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร และ hyaluronate extract 0.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที และต้องพลิกกลับด้านทุกๆ 5 นาที เพื่อให้ตัวอย่างสัมผัสกับสาร propylene glycol และ hyaluronate extract อย่างทั่วถึงทั้งหมด



ภาพประกอบ 3.6 : (a) ชีทมาส์ก, (b) อาหารเลี้ยงเชื้อ, (c) ลิกนิน, (d) เอทานอล, (e) PEG6000, (f) อาราบิก้า, (g) โรบัสต้า แช่ใน propylene glycol และ hyaluronate extract

เมื่อครบกำหนดจึงนำแผ่นตัวอย่างมาแปะลงบนผิวหนังและทำการค่าความชุ่มชื้น โดยแต่ละจุดจะทำการวัดทั้งหมด จุดละ 3 ครั้ง ซึ่งจะทำการวัดก่อนใช้งาน, หลังแปะแผ่นมาส์ก 15 นาที, หลังใช้งานแผ่นมาส์ก 120 นาที และหลังจากการตื่นนอน

ภาพประกอบ 3.7 : การทดสอบความชุ่มชื้นบนผิวหนัง

3.4.10 การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียเซลลูโลส

3.4.10.1 การวิเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy: SEM)

เตรียมตัดตัวอย่างแบคทีเรียลเซลลูโลสขนาด 1×1 เซนติเมตร และนำตัวอย่างไปวางบนที่ใส่ตัวอย่าง จากนั้นนำภาพมาวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกำลังขยาย 70,000 เท่า

3.4.10.2 การวิเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปคโตรมิเตอร์ (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy : FTIR)

เตรียมตัดตัวอย่างแบคทีเรียลเซลลูโลสขนาด 0.5×0.5เซนติเมตร และนำไปวางบนแท่นตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้ช่วงคลื่นการวิเคราะห์ที่ช่วงความยาวคลื่น 4000-400 cm^{-1}

3.4.10.3 การวิเคราะห์ทางจลนศาสตร์ (Fermentation kinetics)

- **ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปทั้งหมดเปลี่ยนเป็นแบคทีเรียลเซลลูโลส (Substrate conversion ratio) ;**

$$S_i(\%) = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100$$

- **ปริมาณแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้ (BC production) ;**

$$P(g/L) = \frac{m_{BC}}{V}$$

- **การอุ้มน้ำ (WHC (Water holding capacity) ;**

$$= \frac{Mass\ of\ water\ removed\ drying\ (g)}{Dry\ weight\ of\ cellulose\ (g)}$$

3.4.11 การหาปริมาณน้ำตาล (Dinitrosalicylic acid method ; DNS)

3.4.11.1 การเตรียมสารละลาย

เตรียมสาร Sodium hydroxide 0.5 กรัม ผสมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมสาร Dinitrosalicylic acid 0.5 กรัม Sodium Potassium Tartrate 15 กรัม และ Sodium Sulphite 0.025 กรัม โดยทุกขั้นตอนที่ทำการเติมสารจะต้องให้ความร้อนและทำการ vortex เพื่อให้สารเป็นเนื้อเดียวกันก่อนจะเติมสารเคมีครั้งต่อไปทุกครั้ง

3.4.11.2 การวัดหาปริมาณน้ำตาล

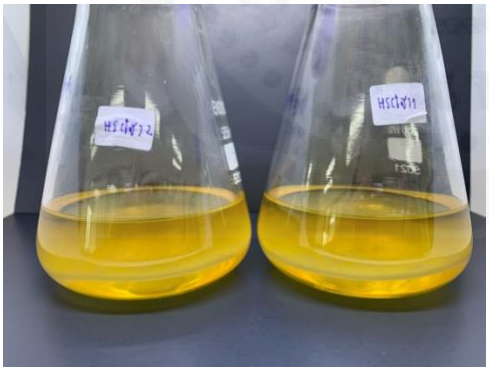
ทำการเก็บตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร ของแต่ละขวดทดลองในวันแรกที่มีการลงเชื้อและวันสุดท้ายก่อนเก็บแบคทีเรียลเซลลูโลส จากนั้นจะทำการวัดหาปริมาณน้ำตาลโดยดูดตัวอย่างด้วยไมโครปิเปต 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 90 ไมโครลิตร เพื่อเป็นการไดรูท จากนั้นจึงผสมกับ DNS 100 ไมโครลิตร แล้วนำไป vortex ให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดจึงนำออกมาพักไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงเติมด้วยน้ำกลั่น 800 ไมโครลิตร และนำไป vortex จากนั้นจึงนำไปวัดวิเคราะห์ด้วยเครื่องเครื่องสเปคโครโฟโตมิเตอร์ (UV-visible) โดยใช้ช่วงความยาวคลื่นในการวิเคราะห์การวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลของการกล้าเชื้อแบคทีเรียลเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975 ที่สภาวะแตกต่างกัน

ผลจากการกล้าเชื้อแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975 เป็นการขยายพันธุ์ (subculture) เชื้อแบคทีเรียที่เป็นของแข็งในหลอดทดลองเพื่อนำมาใช้ในงานวิจัยเป็นการทำให้เชื้อแบคทีเรียมีความแข็งแรงมากยิ่งขึ้น พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การบ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียลเซลลูโลสในสภาวะที่แตกต่างกัน ย่อมทำให้เกิดเซลลูโลสที่ฟอร์มตัวขึ้นมานั้นมีลักษณะต่างกันไป ในภาพ (a) คือการบ่มเพาะเลี้ยงในสภาวะแบบแบบนิ่ง (static culture) เซลลูโลสจะมีลักษณะเป็นแผ่นหนา มีความเหนียวเป็นอย่างมาก ไม่สามารถนำไปตีเชื้อให้กระจายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างทั่วถึง และภาพ (b) คือการบ่มเพาะเลี้ยงในสภาวะการเขย่า (agitate culture) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เซลลูโลสที่ได้จะมีลักษณะเป็นก้อนกลม เล็กๆกระจายทั่วในขวดทดลอง ทำให้สามารถนำไปตีเชื้อได้ดีมากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะแบบนิ่ง



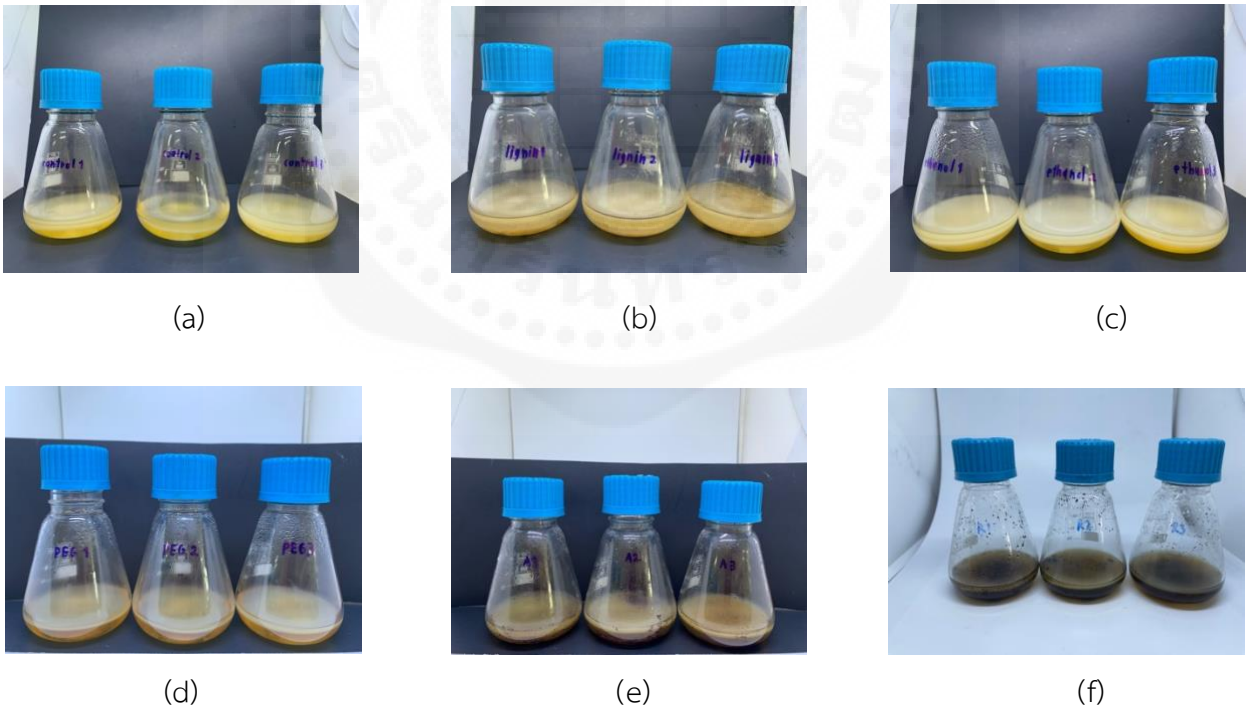
(a)

(b)

ภาพประกอบ 4.1 : (a) แบคทีเรียลเซลลูโลสที่ฟอร์มตัวขึ้นในสภาวะแบบนิ่ง, (b) แบคทีเรียลเซลลูโลสที่ฟอร์มตัวขึ้นหลังจากเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

4.2 ผลของการบ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียลเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975

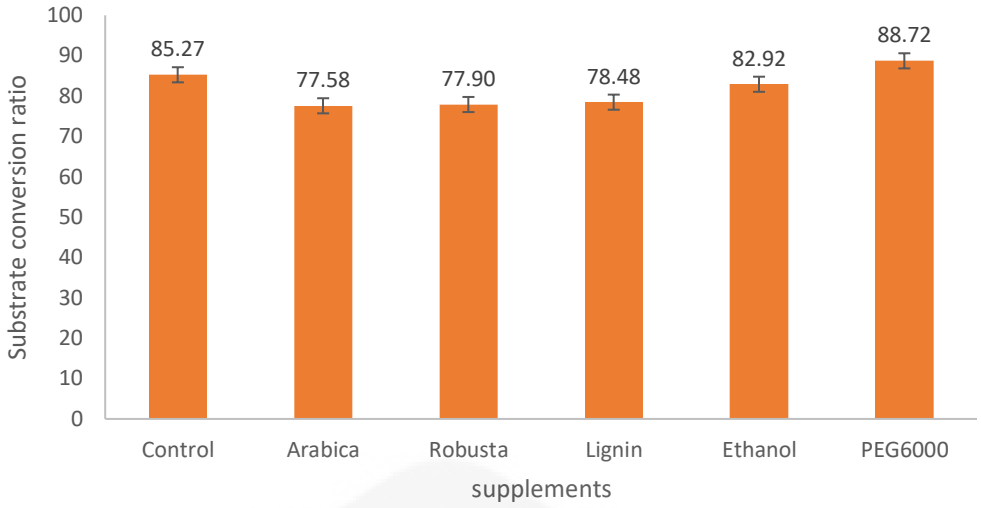
จากการศึกษาเติมอาหารเสริมทั้ง 5 ชนิด ที่บ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียลเซลลูโลสในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 9 วัน ในสภาวะแบบนิ่งโดยใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่า การเติมอาหารเสริมได้แก่ กากกาแฟ 2 สายพันธุ์ คือ อาราบิก้า และ โรบัสต้า, เอทานอล, PEG 6000 และลิกนิน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานนั้นสามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้ ดังรูปที่ 12 พบว่ามีการฟอร์มตัวของเซลลูโลสขึ้นมาเป็นแผ่นภายในขวดทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับ Substrate conversion ratio ดังรูปที่ 13 ที่แสดงผลการใช้ปริมาณน้ำตาลของเชื้อแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975 ซึ่ง PEG 6000 สามารถนำปริมาณน้ำตาลไปใช้ได้ดีกว่าอาหารเสริมตัวอื่นถึง 88.72 เปอร์เซ็นต์ แต่สวนทางกับปริมาณแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตออกมา ดังรูปที่ 14 โดยผลิตออกมาได้น้อยกว่าอาหารเสริมตัวอื่น ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ K.aswini และคณะ ที่มีการศึกษาว่าการเติม PEG 6000 ที่ปริมาณ 7.76 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้มากที่สุด ในขณะที่อาราบิก้าและเอทานอล ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้ดีกว่าเมื่อใส่เป็นอาหารเสริม เนื่องจากการที่ใช้ปริมาณน้ำตาลมากแต่กลับได้ผลผลิตน้อยอาจเกิดจากปริมาณน้ำตาลนั้นแปรเปลี่ยนสภาพไปเป็นอย่างอื่นแทนที่จะผลิตเป็นแบคทีเรียลเซลลูโลส



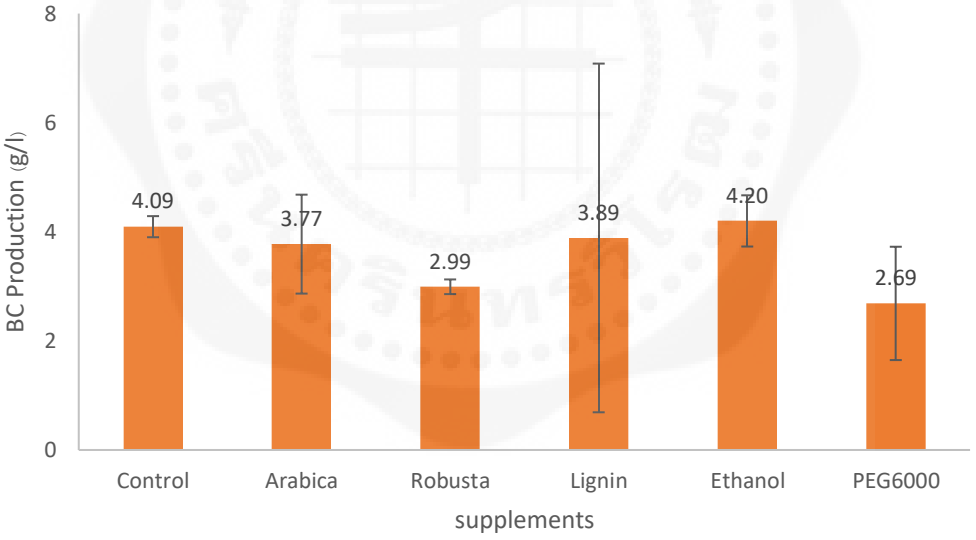
(a) (b) (c)

(d) (e) (f)

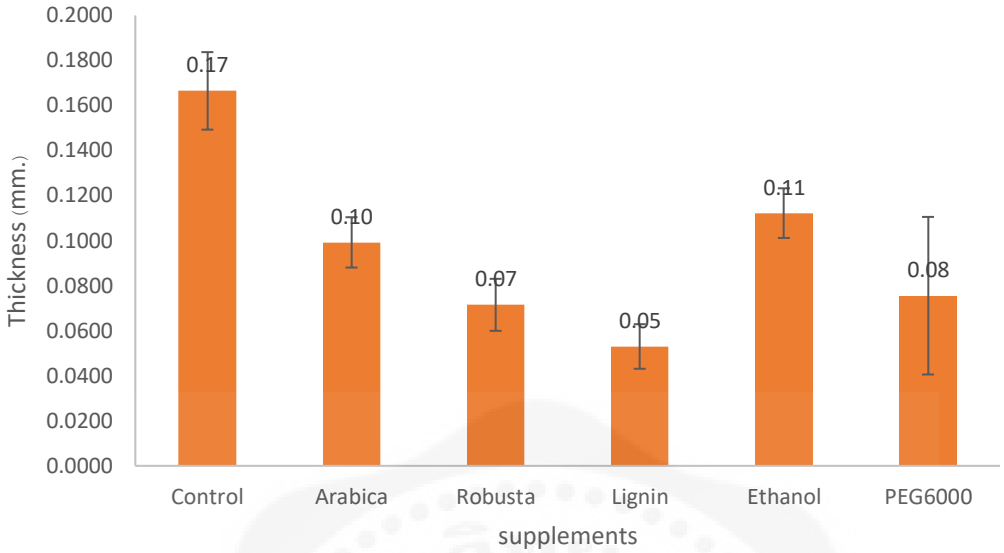
ภาพประกอบ 4.2 : วันสุดท้ายของการเก็บผลผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975 : (a) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน (b) ลิกนิน (c) เอทานอล และ (d) PEG6000 (e) อาราบิก้า และ (f) โรบัสต้า



ภาพประกอบ 4.3 : ปริมาณการใช้น้ำตาลของอาหารเสริมทั้ง 5 ชนิด



ภาพประกอบ 4.4 : การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส

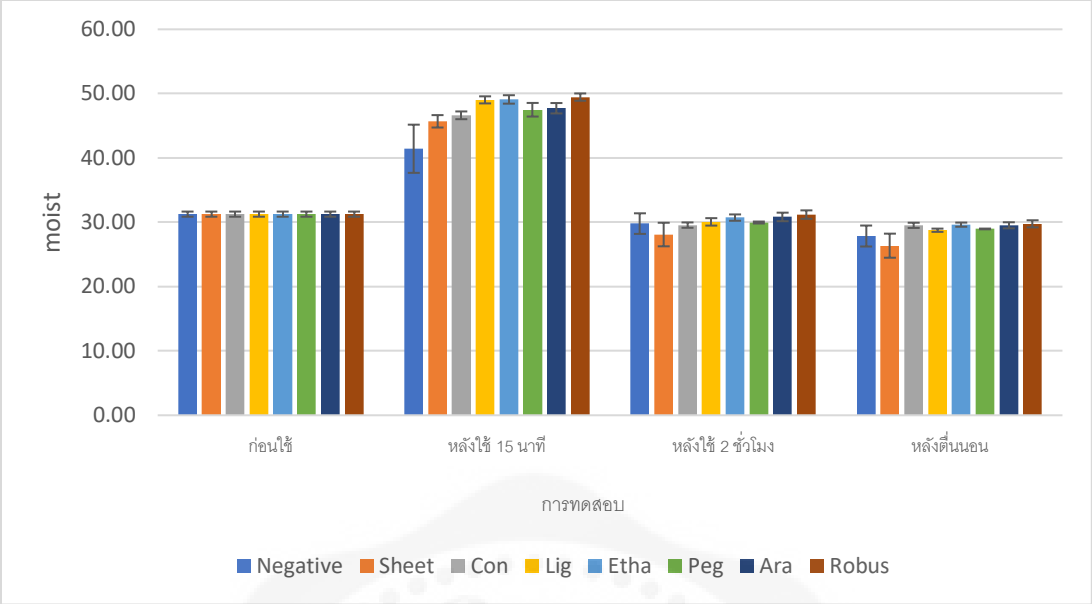


ภาพประกอบ 4.5 : ความหนาของแบคทีเรียลเซลลูโลส

จากการศึกษาความหนาของแบคทีเรียลเซลลูโลสด้วยไมโครมิเตอร์หลังจากการอบเซลลูโลสให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งจะทำการสุ่มวัดบนแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสทั้งหมด 5 จุด และนำมาหาค่าเฉลี่ย พบว่า การเติมอาหารเสริมทั้ง 5 ชนิด ส่งผลทำให้ความหนาของเซลลูโลสนั้นลดลงเมื่อเทียบกับการบ่มเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานเพียงอย่างเดียว เนื่องจากการใส่อาหารเสริมนั้นส่งผลต่อความหนาของแบคทีเรียลเซลลูโลส

4.3 ผลศึกษาค่าความชุ่มชื้น (Fabricate Skin mask)

จากการทดลองการวัดค่าความชุ่มชื้น พบว่าจากกราฟ ตัวอย่างมาส์ก ทั้ง 5 ชนิดและ control จะมีค่าความชุ่มชื้นเท่ากัน ซึ่งอยู่ในช่วงประมาณเดียวกัน เมื่อนำตัวอย่างมาวางไว้บริเวณผิวหนังหลังจาก 15 นาที วัดค่าความชุ่มชื้น พบว่า มาส์ก ทั้ง 5 ชนิด และ control ให้ความชุ่มชื้นที่เพิ่มขึ้นก่อนใช้ และนำตัวอย่างที่เป็น sheet mask หรือ มาส์กชนิดอื่น จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้มาส์กที่ผลิตจากแบคทีเรียที่มีการเติมอาหารเสริมนั้นจะให้ความชุ่มชื้นที่ผิวดีกว่าการไม่ใช้แผ่นมาส์ก



ภาพประกอบ 4.6 : ความชุ่มชื้นในสภาวะต่างๆโดยใช้แบคทีเรียลเซลลูโลสเป็นแผ่นมาส์ก

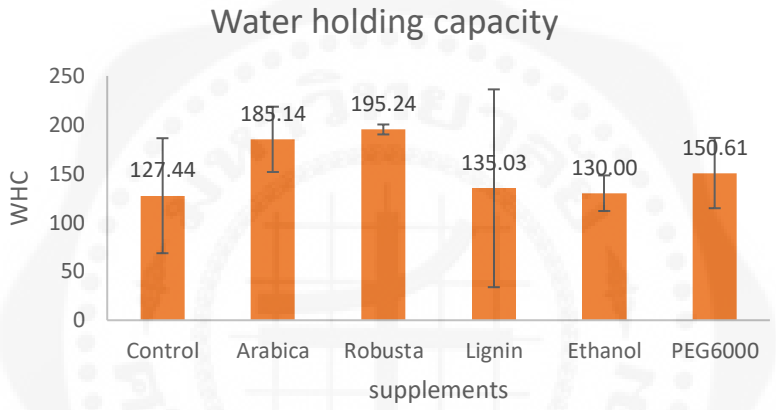
จากรูปที่ 16 และตารางที่1 จะพบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที แผ่นมาส์กที่ทำจากการเติมอาหารเสริมโรบัสต้านั้นสามารถให้ความชุ่มชื้นที่ผิวสูงสุดหลังจากการใช้งาน และเมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที พบว่า ค่าความชุ่มชื้นที่ยังคงอยู่บนผิวนั้นลดลง โดยผิวบริเวณที่มาส์กด้วยแผ่นมาส์กโรบัสต้ายังคงมีความชุ่มชื้นมากกว่าบริเวณผิวที่ใช้มาส์กตัวอื่นมากที่สุด

ตารางที่ 1 : ตารางการทดสอบความชุ่มชื้น

Summary	ก่อนใช้	Sd	หลังใช้ 15 นาที	Sd	หลังใช้ 2 ชั่วโมง	Sd	หลังตื่นนอน	Sd
Negative	31.27	0.40	41.43	3.74	29.80	1.60	27.87	1.63
Sheet mask	31.27	0.40	45.70	0.96	28.10	1.83	26.37	1.87
Control	31.27	0.40	46.63	0.60	29.57	0.42	29.53	0.40
Lignin	31.27	0.40	49.03	0.55	30.07	0.58	28.77	0.25
Ethanol	31.27	0.40	49.10	0.66	30.73	0.49	29.63	0.32
PEG 6000	31.27	0.40	47.50	1.06	29.97	0.15	28.97	0.06
Arabica	31.27	0.40	47.73	0.81	30.83	0.67	29.53	0.47
Robusta	31.27	0.40	49.47	0.57	31.20	0.66	29.77	0.55

4.4 ผลศึกษาการอุ้มน้ำ (water holding capacity)

จากการศึกษาสมบัติการอุ้มน้ำ โดยการนำแบคทีเรียลเซลลูโลสแช่น้ำกลั่นทิ้งไว้เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงคีบแบคทีเรียลเซลลูโลสขึ้นมาและสะบัดเพื่อนำน้ำออก 2 ครั้ง (shake method) จากนั้นนำมาชั่งและทำการบันทึกค่าน้ำหนักคำนวนหาค่า water holding capacity พบว่า โรบัสต้านั้นมีความสามารถในอุ้มน้ำสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับผลภาพ SEM ที่เส้นใยมีความหนาแน่น แสดงให้เห็นว่า การเติมอาหารเสริมโรบัสต้านั้นมีประสิทธิภาพความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีที่สุด



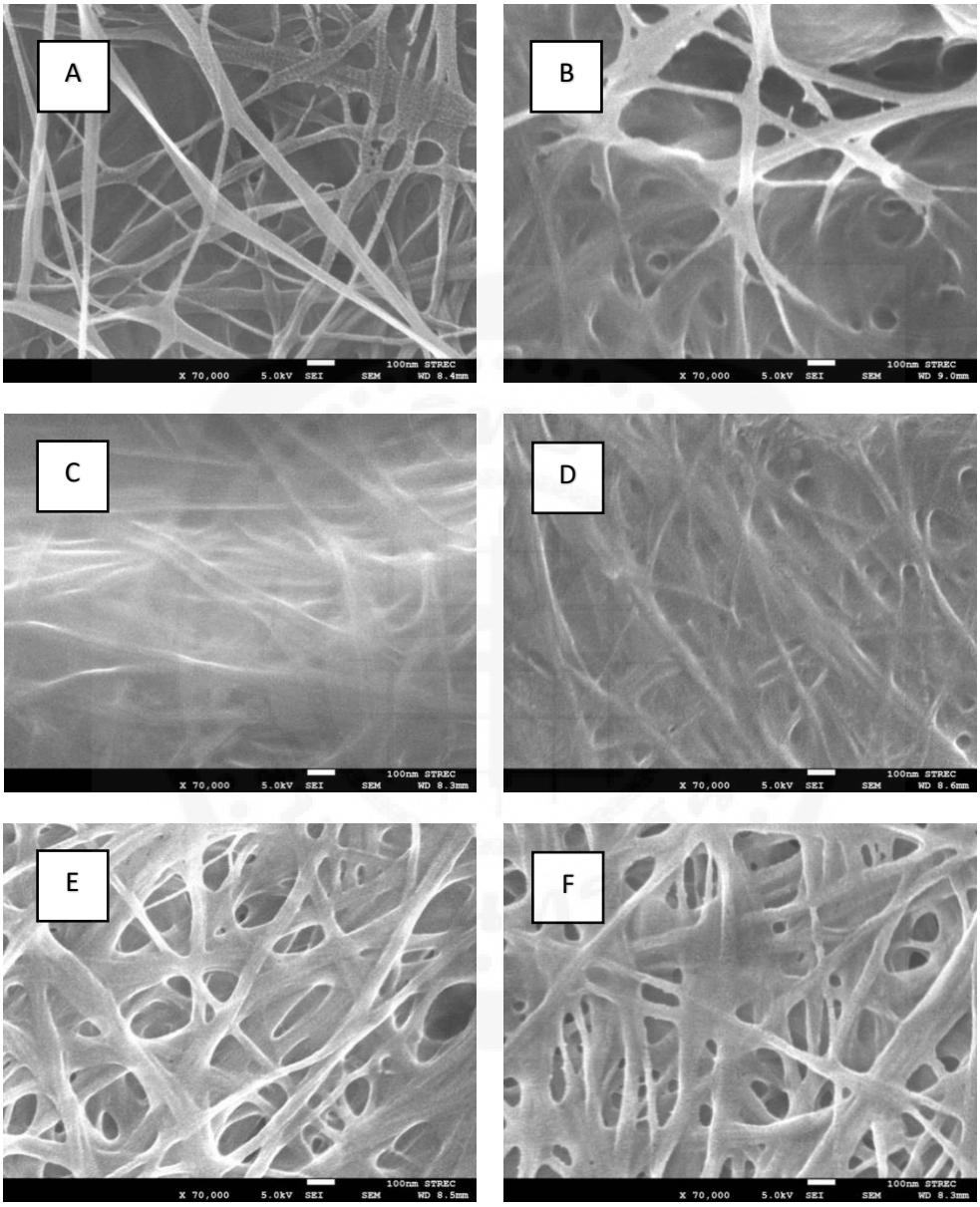
ภาพประกอบ 4.7 : water holding capacity

4.5. การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลส

4.5.1. การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดโดยการนำแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *K. nataicol* TISTR 975 ด้วยการเติมอาหารเสริม 5 ชนิด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานเพื่อเพิ่มผลผลิตเซลลูโลส ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน นำมาวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 70,000 เท่า พบว่า การเติมอาหารเสริมด้วย (c) เอทานอล และ (d) PEG600 เส้นใยของแบคทีเรียลเซลลูโลสมีลักษณะหนาแน่นมากกว่าการเติมอาหารเสริมด้วย (a) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน (b) ลิกนิน (e) อาราบิก้า และ (f) โรบัสต้า อย่างชัดเจน และเส้นใยติดมีการเกาะกลุ่มกันไม่เกิดรูพรุนระหว่างเส้นใย โดยการที่เส้นใยชิดติดกันจะมีความแข็งแรงมากกว่าเส้นใยที่มีรูพรุนมาก จาก

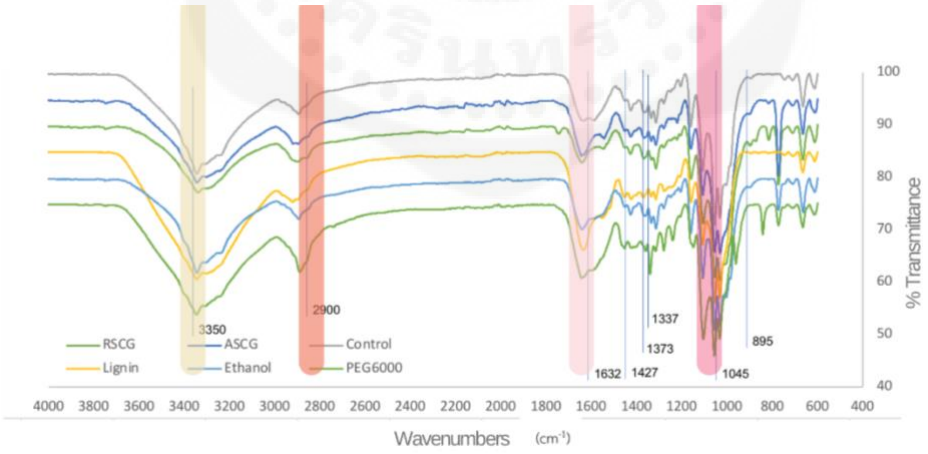
การศึกษาพบว่าการเติมอาหารเสริมที่แตกต่างชนิดกัน ถึงแม้จะใช้แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันก็สามารถส่งผลต่อลักษณะเส้นใยของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตออกมามานั้นมีลักษณะแตกต่างกัน



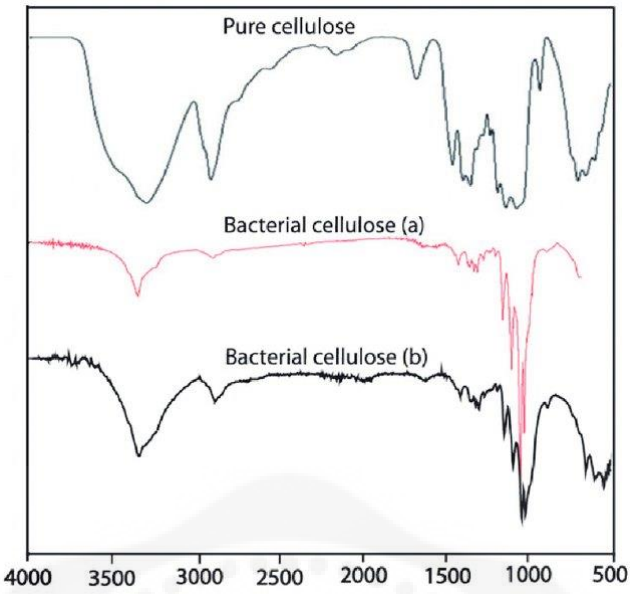
ภาพประกอบ 4.8 : ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตขึ้นโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *K. nataicol* TISTR 975 ด้วยการเติมอาหารเสริม (a) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน (b) ลิกนิน (c) เอทานอล และ (d) PEG600 (e) อาราบิก้า และ (f) โรบัสต้า ภายใต้การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 70,000 เท่า

4.5.2. การวิเคราะห์ด้วยฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)

ผลการวิเคราะห์จากการตรวจสอบลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตโดย *K. nataicol* TISTR 975 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบนิ่ง ด้วยเครื่องฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ในช่วงความยาวคลื่น 4000-500 cm^{-1} เพื่อตรวจสอบหาหมู่ฟังก์ชั่นหลังจากทำให้แบคทีเรียลเซลลูโลสมีความบริสุทธิ์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังแสดงผลการศึกษาดังรูปที่ ตรวจพบว่า มีพีคช่วงการดูดกลืนกว้างที่ช่วงความยาวเลขคลื่นบริเวณ 3350 cm^{-1} ซึ่งมีความสอดคล้องกับการสั่นแบบยืดหดของหมู่ -OH (ไฮดรอกซิล) ถัดมาพบการดูดกลืนการสั่นแบบยืดหดที่ไม่สมมาตรเล็กน้อยที่บริเวณการดูดกลืนในช่วงเลขคลื่น 2900 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับการสั่นยืดของหมู่พันธะ -CH (เมทิล) ถัดมาพบพีคการดูดกลืนที่ตำแหน่งในช่วงความยาวเลขคลื่น 1632 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชั่นคาร์บอนิลเอไมด์ ซึ่งอาจจะมาจากโปรตีนและเซลล์ของแบคทีเรียที่ถูกล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออกได้ไม่หมด[32]และในการดูดกลืนในช่วง 1045 cm^{-1} ซึ่งเกิดการสั่นแบบยืดหดสลับกันไปมาแบบไม่สมมาตรของหมู่พันธะ C-O-C และ C-O-H ตามลำดับ จากที่กล่าวมาข้างต้นนั้นสอดคล้องกับรูปที่ ที่ได้แสดงโครงสร้างของแบคทีเรียลเซลลูโลสและการปรากฏหมู่ฟังก์ชั่นในช่วงการดูดกลืนของ FT-IR



ภาพประกอบ 4.9 : ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR) ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่มีการเติมอาหารเสริม



ภาพประกอบ 4.10 : แสดงหมู่ฟังก์ชั่นทางเคมีของแบคทีเรียลเซลลูโลส

จากการวิเคราะห์แผ่นตัวอย่างแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผ่านการแช่สาร propylene glycol และ hyaluronate extract ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ พบว่า ค่า Lateral order index ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของ cellulose one 100% มีค่าเท่ากับ 1 ดังตารางที่ คือ ค่าทุกตัวของการเติมอาหารเสริมเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสมีค่าเข้าใกล้ 1 โดยเฉพาะกากกาแฟโรบัสต้านั้นมีค่าใกล้เคียง 1 มากที่สุด คือ 0.98 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลลูโลสที่ได้นั้นมีความบริสุทธิ์ อีกทั้งการเติมอาหารเสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานนั้นไม่ส่งผลต่อความบริสุทธิ์ของแบคทีเรียลเซลลูโลส

ตารางที่ 2 : Lateral order index (LOI)

	Control	ASCG	RSCG	Lignin	Ethanol	PEG6000
LOI	0.94	0.95	0.98	0.91	0.95	0.92

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการทดลองผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจากเชื้อแบคทีเรีย *K. nataicola* TISTR 975 โดยการเติม อาหารเสริมทั้งห้าชนิดซึ่งได้แก่ กากกาแฟสายพันธุ์ อาราบิก้า และ โรบัสต้า, ลิกนิน, เอทานอล และPEG 6000 นั้นสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้ ซึ่งแบคทีเรียลเซลลูโลสสามารถเติบโตได้ดีในสภาวะแบบนิ่ง โดยกากกาแฟโรบัสต้าสามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสเนื่องจากกากกาแฟมีสารอาหารที่จำเป็นที่เอื้อต่อการผลิต แบคทีเรียลเซลลูโลสมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานเพียงอย่างเดียว จึงทำให้มีสมบัติการอุ้มน้ำที่ดี ซึ่งผลการศึกษา SEM พบว่าที่กำลังขยาย 70,000 เท่า ethanol และ PEG6000 จะมีเส้นใยที่ติดกันไม่มีรูพรุน จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่มีการเติมอาหารเสริมด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์ แสดงดังภาพประกอบ 4.9 ซึ่งพบแถบการดูดกลืนในช่วงเลขคลื่น 3350 cm^{-1} เกิดการยืดของหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งซ้อนทับกับแถบการสั่นของหมู่ฟังก์ชั่นของหมู่เมททิล การดูดกลืนในช่วงเลขคลื่น 2900 cm^{-1} แถบการดูดกลืนที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1632 cm^{-1} เกิดแถบการสั่น carbonyl amide และการดูดกลืนในช่วง 1045 cm^{-1} เกิดการลั่นแบบยืดหดของหมู่ C-O-C และ C-O-H ซึ่งสัมพันธ์กับโครงสร้างหมู่ฟังก์ของแบคทีเรียลเซลลูโลส ทำให้ยืนยันได้ว่าเซลลูโลสที่เกิดขึ้นจากการเติมอาหารเสริมทั้ง 5 ชนิด นั้นเป็นแบคทีเรียลเซลลูโลสจริง

อีกทั้งยังมีโครงสร้างแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากการเติมอาหารเสริมทั้ง 5 ชนิด พบว่า มีความบริสุทธิ์ โดยเฉพาะเซลลูโลสที่ผลิตจากการเติมอาหารเสริมโรบัสต้ามีความบริสุทธิ์มากที่สุดซึ่งอ้างอิงจากค่า Lateral order index (LOI) ถึง 0.98 มีค่าเข้า ใกล้ 1 นอกจากนี้การนำกากกาแฟ โรบัสต้า อาราบิก้า และลิกนิน สามารถนำมาเป็นแหล่งในการผลิตเซลลูโลส อีกทั้งยังราคาถูก และเป็นการนำวัสดุเหลือใช้มาทำให้เกิดประโยชน์สูงสุดอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ :

ข้อเสนอแนะเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาต่อมีดังนี้

1. ควรศึกษากับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นควบคู่กันไปด้วย
2. ควรศึกษาปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสของสายพันธุ์แบคทีเรียลที่นำมาศึกษาในงานวิจัย

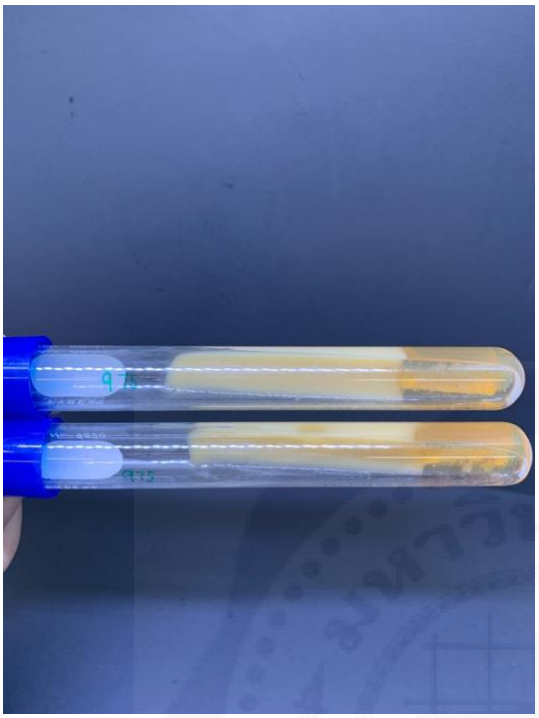
เอกสารอ้างอิง

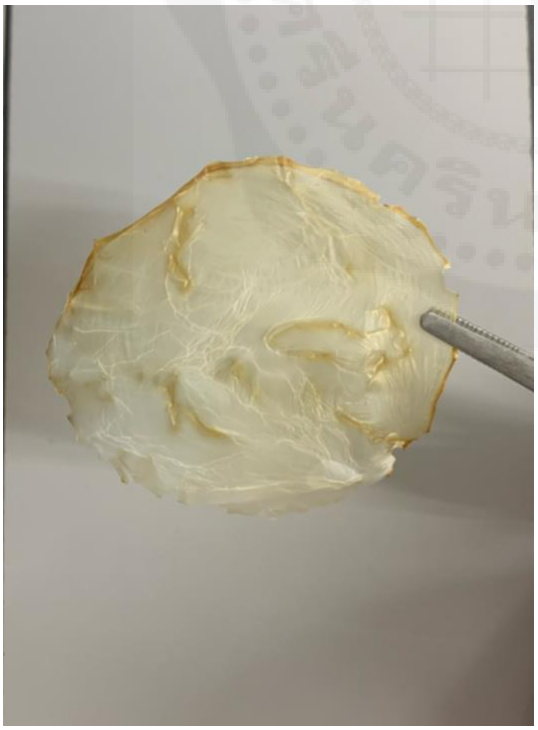
1. กรมวิชาการเกษตร มปป. (2561).ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และพันธุ์กาแฟ. สืบค้น 13 ตุลาคม 2564, จาก: http://www.doa.go.th/hortold /stories/academy/coffee/botanyandculti var.pdf,
2. กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. คู่มือการพัฒนาและการลงทุนผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิง.25 ;7-9.
3. จรียา ยิ้มรัตนบวร.คู่มือปฏิบัติการชีววิทยาสิ่งแวดล้อม.มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.2548;10-12.
4. ชนิดาภา ธนะศรีรางกูร, เพชรดา ปินใจ และ พิลานี ไวถนอมสัตย์. การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและประสิทธิภาพ ในการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 2561,2
5. ณัฏฐีวรรณ ปุ่นวัน. (2552). การทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ความร้อนและสารเคมี.การบริหารจัดการความรู้ด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 2,6-11.
6. ประมวล ทรายทอง. บทบาทของแบคทีเรียกรดอะซิติกในอุตสาหกรรมอาหาร. ธุรกิจและอุตสาหกรรม. 2554,316-321.
7. นายภานุพงศ์ กังหันทิพย์. ปัจจัยที่มีผลติพฤติกรรมการเลือกใช้บริการร้านกาแฟโบราณในเขตกรุงเทพและปริมณฑล. คณะพานิชยศาสตร์และการบัญชี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 2559;23.
8. พิพัฒน์ สุดยิ่ง. การผลิตและประเมินคุณลักษณะของนาโนแบคทีเรียลเซลลูโลสจาก Komagataeibacter nataicola โดยใช้น้ำซาวข้าว.มหาวิทยาลัยศิลปากร คณะวิทยาศาสตร์. 2560,1-130.
9. รพีพรรณ กองตูม. กากกาแฟ : มูลค่าเพิ่มและการใช้ประโยชน์. การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 5; ราชภัฏหมู่บ้านจอมบึงวิจัย. 2560;345.
10. ริกาญจน์ ฉัตรสกุลวิไล. ลิกนิย-แทนนิน.กรมโรงงานอุตสาหกรรม.2556,1-4.
11. รศ.ดร.นฤมล มาแทน.FTH-212ปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร.เทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์. 2560,6.
12. ไชยยันต์ ไชยยะ, วราภรณ์ ธนะกุลรังสรรค์, ปทุมทิพย์ ต้นทับทิมทอง. อิทธิพลของสารกระตุ้นที่มีต่อหมู่หน้าที่และประสิทธิภาพในการดูดซับของถ่านกัมมันต์ที่ผลิตจากกากกาแฟ. โครงการวิจับทุนสนับสนุสงานวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ. 2550,2-13.
13. Alaban, C. A. Studies on the optimum conditions for Nata de coco bacterium or Nata"formation in coconut water. The Philippine Agricultural Scientist.1962,490- 515.

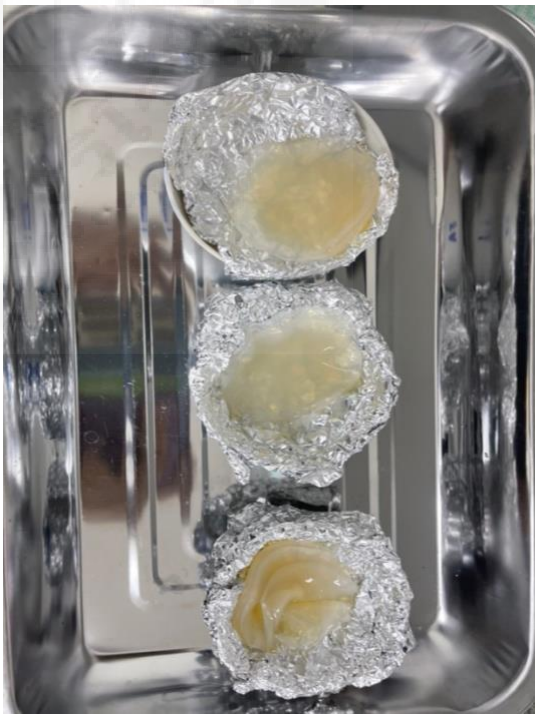
14. Bodin, A., Bäckdahl, H., Petersen, N. and Gatenholm, P. Bacterial Cellulose as Biomaterial A2 - Ducheyne, Paul. In Comprehensive Biomaterials. 2011,405-410.
15. Churairat Moukamnerd, Keeratiya Ounmuang, Natthakan Konboa and Chayatip Insomphun. Bacterial Cellulose Production by Komagataeibacter nataicola TISTR 2661 by Agro-waste as a Carbon Source.2020,17-18.
16. Claudia P, Passus and Manuel A, Coimbia. Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds. Carbohydrate Polymers. 2013;626–633.(11)
17. D. Pujol, C. Liu, J. Gominho, M.À. Olivella, N. Fiol, I. Villaescusa , and H. Pereira. The chemical composition of exhausted coffee waste. Industrial Crops and Products. 2013,423-429.
18. Haifang Liu et al.Influence of Adding Different Poly (ethylene glycol) in the Biosynthesis of Bacterial Cellulose.2012,1-2.
19. Heng Zhang, Xuran Xu, Xiao Chen, Fanshu Yuan, Bianjing Sun, Yunhua Xu, et al. Complete genome sequence of the cellulose-producing strain Komagataeibacter nataicola RZS01. Scientific Reports. 2017,1-8.
20. Hestrin, S. and Schramm, M. Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. Biochemical Journal.1954,345-352.
21. Julaluk Khemacheewakul.Factors affecting production of cellulose by Acetobacter sp.and fermentation technology.2015,92.
22. Julaluk Khemacheewakul.The Production of Bacterial Cellulose from Acetobacter xylinum and Application in Industry.2016,26-29.
23. Karina Carvalho de Souza et al.Kinetic Study of a Bacterial Cellulose Production by Komagataeibacter Rhaeticus Using Coffee Grounds and Sugarcane Molasses.2021;1-3.
24. K. Aswini, N. O. Gopal and Sivakumar Uthandi. Optimized culture conditions for bacterial cellulose production by Acetobacter senegalensis MA1.2020,1,4-5,12.
25. Mana Sezdi, and Gamze Yoleri. STERILIZATION PERFORMANCE OF AUTOCLAVE UNITS ON CANNULAR MATERIALS.2014,1.

26. Masaoka, S., Ohe, T. and Sakota, N. Production of cellulose from glucose by Acetobacter xylinum. Journal of Fermentation and Bioengineering.1993;18-22.
27. Mussatto, Carneiro, Silva, Roberto, Teixeira. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. Carbohydrate Polymers. 2011;368–374.(16)
28. Merck.(2556). โพลีเอทิลีนไกลคอลสืบค้น 9 มกราคม 2565.จาก https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/product/sial/p5413?gclid=EAIaIQobChMI0aGHpu-i9QIVjpJmAh3lLQQxEAMYASAAEgLWPvD_BwE.
29. Narasimharao Kondamudi, Susanta K, Mohapatra, and Mano Misra. Spent Coffee Grounds as a Versatile Source of Green Energy. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008,11757-11760.
30. Rocio Campos-Vega, Guadalupe Loarca-Piña, Haydé A. Vergara-Castañeda, and B. Dave Oomah. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. Trends in Food Science & Technology. 2015,24–36.
31. Sameeha Syed Abdul Rahman, T. Vaishnavi, G. Sai Vidyasri, K. Sathya, P. Priyanka, Ponnusami Venkatachalam & Sugumaran Karuppiah. Production of bacterial cellulose using Gluconacetobacter kombuchae immobilized on Luffa aegyptiaca support.2021,1.
32. Shezad et al., “Physicochemical and Mechanical Characterization of Bacterial Cellulose Produced with an Excellent Productivity in Static Conditions Using a Simple Fed-Batch Cultivation Strategy.
33. Stanbury, F. P. and Whitaker, A. Principles of fermentation technology. Oxford: Pergamon Press.1984,4
34. Suneit Monwiseit,Pramode Thamarat,Jaroowan Siripanporn,Siriporn Ua-angkoon.Microbial Contaminants in Nata de coco Fermentation Process and Effect of Acetic Acid, Alcohol and Potassium Metabisulphite on Growth of Bacterial.2000,198.
35. Zhigang Lu et al.Effects of alcohols on bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum 186.2011,2-5.

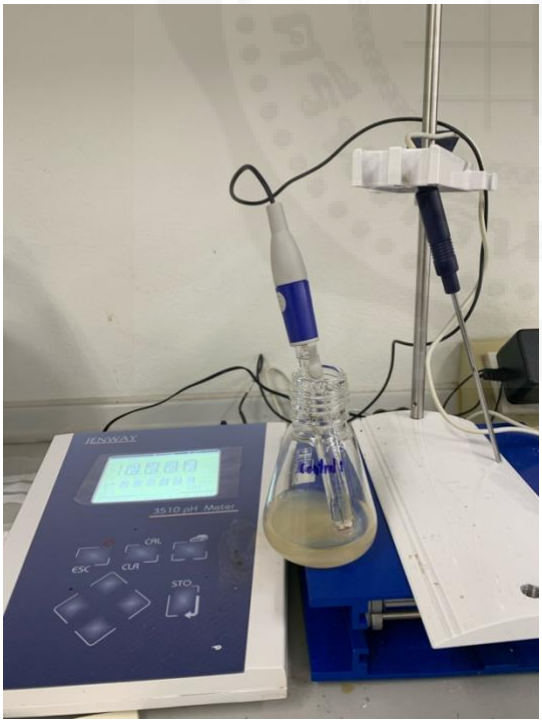
“ภาคผนวก”







NANNY
Breast Milk
Storage Bags
BPA Free
mL
250
200
150
100
50
8 oz
7
6
5
4
3
2
1


3510 pH Meter
CAL
ESC
CLR
STO

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวประณัฐดา ไตรวงค์ย้อย

วัน เดือน ปี เกิด วันที่ 11 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2543

สถานที่เกิด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัด กรุงเทพมหานคร

วุฒิการศึกษา มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียน สายปัญญา ในพระบรมราชินูปถัมภ์ จังหวัด กรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2560

วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวัสดุศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2564

ชื่อ-สกุล นางสาวภาสินี สงอินทร์

วัน เดือน ปี เกิด วันที่ 8 เดือน กันยายน พ.ศ. 2541

สถานที่เกิด โรงพยาบาลพระนั่งเกล้า จังหวัด นนทบุรี

วุฒิการศึกษา มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียน ปากเกร็ด จังหวัด นนทบุรี พ.ศ.2559

วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวัสดุศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2564