

การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยเชื้อ *Acetobacter xylinum* โดยการให้น้ำเสีย จากกระบวนการแปรรูปสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอน

Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* using wastewater from pineapple processing as a carbon source

จุไรรัตน์ เม้ากานเนต^{1*}, สลาลี แสนช้าง¹, อาณัฐ ครุฑจันทร์¹ และ ชรินทร์ เทชะพันธุ์¹
Churairat Moukamnerd^{1*}, Salalee Saenchang¹, Anat Krutjan¹
and Charin Techapun¹

บทคัดย่อ: เพื่อลดต้นทุนการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส (BC) น้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการแปรรูปสับปะรดจึงถูกนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดยเชื้อ *Acetobacter xylinum* พบว่าสามารถผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสได้จากน้ำเสียโดยตรงโดยให้น้ำหนักแห้งของเซลลูโลสเท่ากับ 1.19 ± 0.12 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อ 100 มิลลิกรัมของน้ำเสียสับปะรดที่เวลา 10 วัน ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่ผลิตได้จากอาหาร HS (0.57 ± 0.31 กรัม/น้ำหนักแห้ง) เพื่อเพิ่มผลผลิตของ BC ได้ศึกษาการเติมสารอาหารโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) กรดแอซีติก กรดซิตริก และกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในน้ำเสียจากสับปะรด พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ BC ได้โดยการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ร้อยละ 0.1 ต่อปริมาตร ให้น้ำหนักแห้งของเซลลูโลสถึง 4.05 ± 0.11 กรัม และการเติมกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้น้ำหนักแห้งของเซลลูโลสถึง 3.65 ± 0.12 กรัม นอกจากนั้นยังพบว่าการเติมกรดซิตริกยังช่วยเพิ่มคุณสมบัติการอุ้มน้ำของเซลลูโลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียอีกด้วย โดยค่าการอุ้มน้ำเพิ่มขึ้นกว่า 1.22 เท่าจากน้ำเสียจากสับปะรดที่ไม่เติมสารอาหารเพิ่มเติม จากผลการทดลองจะเห็นได้ถึงแนวทางในการลดต้นทุนการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดยใช้น้ำเสียจากกระบวนการผลิตสับปะรดกระป๋อง อีกทั้งยังสามารถช่วยเพิ่มมูลค่าและลดปริมาณของเสียจากกระบวนการผลิตได้อย่างเหมาะสมอีกด้วย

คำสำคัญ: แบคทีเรียเซลลูโลส, ไบโอสเซลลูโลส, *Acetobacter xylinum*, สับปะรด, น้ำเสีย

ABSTRACT: In order to reduce the cost of bacterial cellulose (BC) production, wastewater from pineapple processing was used as a substrate to produce bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum*. Pineapple wastewater used in the studied was from the original pineapple processing without any modification. The BC yield reached to 0.19 ± 0.12 g-dry weight/100 ml-pineapple wastewater after 10 days of fermentation, which was significantly higher than using Hestrin & Schramm medium (HS) (0.57 ± 0.31 g-dry weight). To improve the production yield, supplements of KH_2PO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, acetic acid, citric acid and ascorbic acid at various concentration, were added to pineapple wastewater. The results showed that the addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and acetic acid at 0.1% (w/v)

¹ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50100

Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100

* Corresponding author: churairat.m@cmu.ac.th

and 1% (w/v) resulting in 4.05 ± 0.11 and 3.65 ± 0.12 g-dry weight of BC, respectively. Moreover, the addition of citric acid increased water holding activity to 1.22 times compared to pineapple wastewater without any addition substances. In conclusion, the wastewater from pineapple processing could be used as an alternative low cost substrate for BC production.

Keywords: Bacterial cellulose, Biocellulose, *Acetobacter xylinum*, Pineapple, Wastewater

บทนำ

เซลลูโลส (cellulose) เป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งถูกผลิตขึ้นโดยพืชเป็นส่วนใหญ่ แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียจำพวก *Gluconacetobacter*, *Sarcina* และ *Agrobacterium* ก็สามารถผลิตเซลลูโลสชนิดนี้ได้เช่นกัน อาจเรียกเซลลูโลสนี้ว่า “แบคทีเรียเซลลูโลส” หรือ “ไบโอเซลลูโลส” มีคุณสมบัติเฉพาะเช่น มีความบริสุทธิ์สูง สามารถดูดซับน้ำได้ดี ปริมาณของผลึก การเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันและความแข็งแรงที่มากกว่าเซลลูโลสจากพืช (Dayal et al., 2013) นอกจากนั้นยังไม่มีส่วนประกอบของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสอีกด้วย ไบโอเซลลูโลสนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย ไม่ว่าจะเป็นทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร พลาสติก สี หรือความงาม (Esa, Tasirin and Rahman, 2014)

จุลินทรีย์สามารถผลิตเซลลูโลสได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนได้จากน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส กาบน้ำตาล ไฮโดร กรีเซอรอล แมนนิทอล และอะราบินอส แต่ในบรรดาน้ำตาลทั้งหมด แมนนิทอล และฟรุคโตสให้ผลการผลิตที่ดีที่สุด (Carreira et al., 2011) แต่เนื่องจากราคาที่สูงของน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้ทำให้แบคทีเรียเซลลูโลสที่ได้มีราคาสูงตามไปด้วย ในปัจจุบันได้มีการพัฒนางานวิจัยเพื่อลดต้นทุนการผลิตเซลลูโลสออกมาอย่างแพร่หลาย มีการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกเพื่อลดต้นทุนการผลิต เช่น เศษเหลือจากต้นมะม่วงหิมพานต์ (Pacheco et al., 2017) มะกอกแห้งบด (Gomes et al., 2013) น้ำผลไม้ (Kongruang 2008) น้ำเสียจากโรงงานทำลูกอม (Li et al., 2015) และแอลกอฮอล์ (Goelzer et al., 2009) เป็นต้น

ประเทศไทยธุรกิจผลไม้แปรรูปถือว่าเป็นอีกหนึ่งธุรกิจที่ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมาก

จากรายงานของสำนักวิจัยเศรษฐกิจพบว่าประเทศไทยส่งออกสับปะรดแปรรูป โดยเฉพาะสับปะรดกระป๋องเป็นรายใหญ่ที่สุดของโลก เปรียบเทียบกับประเทศฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย เกาหลี และจีน สร้างรายได้ให้ประเทศปีละ 13,000 ล้านบาท (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2557) และนอกจากสับปะรดกระป๋องแล้วยังมีผลิตภัณฑ์จากสับปะรดอื่นอีก เช่น น้ำสับปะรดเข้มข้น น้ำสับปะรดกระป๋อง สับปะรดแช่แข็ง และผลิตภัณฑ์แปรรูปอย่างง่ายด้วย ตัวอย่างเช่น สับปะรดกวน สับปะรดอบแห้ง สับปะรดทอด เป็นต้น ซึ่งในกระบวนการผลิตสับปะรดกระป๋องไม่ว่าจะระดับอุตสาหกรรม หรือระดับท้องถิ่น ตั้งแต่รับวัตถุดิบเข้าจนบรรจุลงกระป๋องพร้อมส่งออกสู่ตลาดล้วนมีขั้นตอนและกระบวนการต่างๆ มากมาย โดยทุกกระบวนการต่างมีของเสียทั้งชนิดที่เป็นของแข็งและชนิดที่เป็นของเหลวเกิดขึ้น อาทิ เปลือก แกนสับปะรด สับปะรดเสีย ตลอดจนน้ำที่ใช้ล้างสับปะรดหลังจากผ่านการปลดเปลือก ของเสียเหลือทิ้งที่เป็นของแข็งมีรายงานว่าสามารถนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ (สุมน, 2552) ส่วนของเสียที่เป็นของเหลว ซึ่งพบว่ามีความเข้มข้นสูง มีความจำเป็นต้องนำไปบำบัดก่อนปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งค่าใช้จ่ายที่สูงสูญเสียไปกับการบำบัดของเสียล้วนเป็นต้นทุนการผลิตทั้งสิ้น

แนวคิดข้างต้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจากน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตสับปะรดกระป๋อง โดยใช้จุลินทรีย์ในตระกูล *Acetobacter* เพื่อลดต้นทุนในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส และลดปัญหาน้ำเสียจากกระบวนการแปรรูปสับปะรด โดยมีการศึกษาสภาวะ สารอาหารและกระบวนการที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส

วิธีการศึกษา

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ *Acetobacter xylinum* จากสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Hestrin & Schramm (HS) (2% กลูโคส, 0.5% เปปโตน, 0.5% สารสกัดจากยีสต์, 0.27% ของ Na_2HPO_4 และ 0.15% กรดซิตริก) และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

การเตรียมวัตถุดิบ

น้ำเสียจากกระบวนการผลิตสับปะรดกระป๋องถูกจำลองขึ้นในห้องทดลองโดยใช้สับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวีย หรือพันธุ์ศรีราชา วัสดุเศษเหลือ เช่น เปลือกหิว และแกนสับปะรดถูกนำมาคั้นเอาน้ำออกแล้วนำไปผสมกับน้ำที่ใช้ล้างสับปะรดหลังปอกนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อการทดลองต่อไป

การผลิตไบโอเซลลูโลสด้วย *Acetobacter xylinum*

เชื้อจุลินทรีย์ร้อยละ 10 ถูกเติมลงใน 100 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ HS น้ำเสียสับปะรดจำลอง และน้ำเสียสับปะรดจำลองที่มีการเติมสารอาหารเพิ่มเติม คือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 ในปริมาณ 0.1% 0.5% และ 1% กรดซิตริก (0.1, 0.15, 2 และ 3 %w/v) กรดแอสคอร์บิก (0.5, 1, 3, 5 และ 7 %v/v) และกรดแอสคอร์บิก (0.25, 0.5, 0.75 และ 1 %w/v) บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 13 วัน

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด ด้วยวิธี Dinitrosalicylic assay, DNS (Miller, 1959) ปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC (In-house method based

on compendium of method for food analysis (2003)) ค่าความเป็นกรดต่าง (AOAC, 2000) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายอยู่ (Brix Refractometer) น้ำหนักแห้งของ BC (Cheng, Catchmark and Demirci, 2009) ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) และคุณสมบัติการอุ้มน้ำ (Water holding activity, WHC) ของแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Water holding activity, WHC} = \frac{\text{Gram (water)}}{\text{Gram (cellulose)}}$$

การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy: SEM)

ทำการศึกษาโครงสร้างของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ได้จากตัวอย่างน้ำเสียที่ได้จากการจำลองกระบวนการผลิตสับปะรดกระป๋องที่ผ่านการอบแห้งไปทำการส่องกล้อง Scanning electron microscopy (SEM) เพื่อศึกษาโครงสร้าง และลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ได้

การวิเคราะห์ทางสถิติ ในแต่ละการทดลองมีการทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยค่าทางสถิติวิเคราะห์ด้วยวิธี One-way ANOVA ค่าความต่างทางสถิติจะถูกพิจารณาเมื่อ $P \leq 0.05$

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การจำลองน้ำเสียจากโรงงานสับปะรดกระป๋องโดยใช้สับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวีย หรือพันธุ์ศรีราชา ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง จากการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีเริ่มต้นของน้ำเสียจากการจำลอง พบว่ามีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ 5.4 °brix มีค่าน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 20.74 ± 0.04 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลกลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส และน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 1.09,

2.73, 0.56 และ 4.38 ตามลำดับ (Table 1) มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3.75 เนื่องจากในน้ำเสียจากการจำลองนี้ทำมาจากสับประดะจึงมีกรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดมาลิก กรดซิตริก กรดแอซิก และกรดออกซาลิก เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย (Kurosumi et al., 2009)

Table 1 Compositions of wastewater from pineapple processing

Parameters	Wastewater from pineapple processing (WPP)
pH	3.75
Reducing sugar (g/L)	20.74
Glucose (%)	1.09
Sucrose (%)	2.73
Fructose (%)	0.56
Total sugar (%)	4.38

การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. xylinum* ในอาหาร Hestrin & Schramm (HS) และน้ำเสียจากสับประดะพบว่าเชื้อมีการเจริญได้ดี น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่อง น้ำหนักแห้งของ BC ซึ่งหลังจากการหมักเป็นเวลา 10 วัน ได้ 0.57 ± 0.31 และ 1.19 ± 0.12 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS และน้ำเสียจากสับประดะ ตามลำดับ (Figure 1) จะเห็นได้ว่าในน้ำเสียจากสับประดะให้ปริมาณการผลิต BC สูงกว่าถึง 2 เท่า ($P < 0.05$) ซึ่งจากการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของน้ำตาลในน้ำเสียน้ำสับประดะก็แสดงถึงส่วนประกอบของน้ำตาลต่าง ๆ นอกจากกลูโคส ซึ่งก็คือ น้ำตาลฟรุคโตส ซูโครส ทั้งนี้ยังมีสารอาหารอื่น เช่น แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ประกอบอยู่ด้วย (Seker and Mohd Zain, 2014) นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยอีกหลายชิ้นได้อธิบายไว้ว่าการจะเพิ่มผลผลิตของ BC นั้นจำเป็นต้องมีส่วนประกอบของน้ำตาลหลายชนิดในอาหารไม่ควรจะใช้กลูโคสเป็นแหล่งน้ำตาลเดียว แต่ควรที่จะเพิ่มน้ำตาลซูโครสและฟรุคโตสเข้าไปเป็นแหล่งคาร์บอนด้วย และในอาหาร HS นั้นก็มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวเท่านั้น ซึ่งแตกต่างจากในน้ำเสียของสับประดะ (Kurosumi et al., 2009, Gomes et al., 2013)

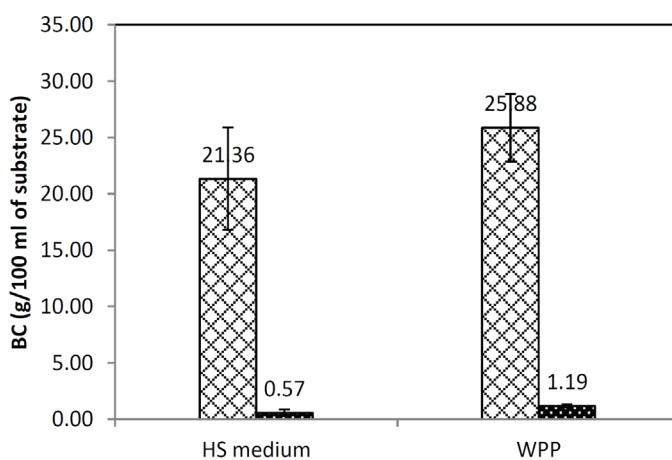


Figure 1 Wet weight (■) and dry weight (■) of bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* from HS medium and wastewater from pineapple processing (WPP) (10 days of incubation)

การศึกษามลกระทบของค่าความเป็นกรดต่างต่อการผลิต BC ของเชื้อ *A. xylinum* ในน้ำเสียสับปะรดที่มีการปรับค่ากรดต่างที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 โดยทำการบ่มเป็นเวลา 13 วัน พบว่าค่าความเป็นกรดต่างที่ 5 ให้ค่าทั้งน้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้งสูงที่สุด รองลงมาคือที่ pH 6 (Figure 2) ซึ่งจากผลการทดลองนี้ใกล้เคียง

กับรายงานเกี่ยวกับค่ากรดต่างที่เหมาะสมต่อการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งวัตถุดิบจะอยู่ในช่วง 4.5-6.0 (Alaban, 1962) ดังนั้นเพื่อรักษาภาวะที่ดีที่สุดในการหมักควรควบคุมให้ค่ากรดต่างในช่วง 4-6 สำหรับ *A. xylinum*

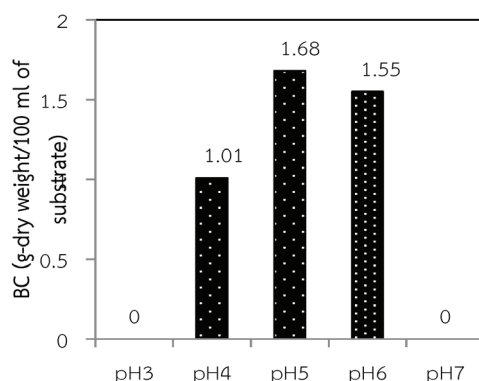


Figure 2 Dry weight of bacterial cellulose produced by *A. xylinum* from wastewater from pineapple processing adjusted pH 3, 4, 5, 6 and 7 (13 days of incubation)

เพื่อเพิ่มผลผลิต BC จากน้ำเสียสับปะรดและลดระยะเวลาในการบ่ม การเติมสารอาหารเพิ่มเติมลงในน้ำเสียสับปะรดเป็นอีกแนวทางหนึ่ง จากค่าน้ำหนักแห้งใน Figure 3 พบว่าเมื่อเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NP) และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NS) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.5 และ 1 สามารถผลิต BC ได้สูงกว่าในน้ำเสียจากสับปะรดที่ไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม โดยการเติม NP และ NS ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของ BC สูงถึง 3.52 ± 0.37 ($P < 0.05$) และ 4.05 ± 0.11 กรัม ($P < 0.05$) ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NP และ NS เป็นร้อยละ 1 พบว่าน้ำหนักแห้งมีค่าลดลง โดยจากการศึกษาของ Gomes et al. (2013) พบว่าการเติม NP และ NS ในความเข้มข้นที่สูงส่งผลให้เชื้อ *Gluconacetobacter xylinus* มีอัตราการเจริญสูงขึ้นส่งผลให้ผลิต BC ลดน้อยลงเนื่องจากจุลินทรีย์จะทำการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าการผลิตเซลลูโลส

เพื่อศึกษามลกระทบของการเติมฟอสเฟต และแมกนีเซียม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4 , P) และ แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4 , Mg) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.5 และ 1 ได้ถูกเติมลงไป ในน้ำเสียจากสับปะรด ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำหนักแห้งหลังการบ่มของ BC หลังจากเติมสารประกอบ P และ Mg ลงไปแล้วเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย สอดคล้องกับการศึกษาของ Carreira et al. (2011) ที่เมื่อเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตลงในสารสกัดเนื้อองุ่นสามารถเพิ่มปริมาณ BC ได้สูงถึงร้อยละ 85 เนื่องจากสารสกัดองุ่นเริ่มต้นไม่มีแหล่งฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ ขณะที่การศึกษาก่อนผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจากสารสกัดจากเศษมะกอกของ Gomes et al. (2013) พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตส่งผลให้การผลิตเซลลูโลสลดลง อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างกันขององค์ประกอบเศษวัสดุที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยสารสกัดจากเศษมะกอกมีไฮโดร

เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีรายงานว่าไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วย (Carreira et al., 2011) ขณะที่น้ำเสียจากสับปะรดประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ช่วยส่งเสริมการผลิตเซลลูโลสได้ดีขึ้น (Seker and Mohd Zain, 2014) ดังนั้นการเพิ่มฟอสฟอรัสในความเข้มข้นที่เหมาะสมลงในแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มผลผลิต BC ได้ จากการนับจำนวนเซลล์ของเชื้อ *A. xylinum* พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของการเพิ่มจำนวนของเชื้อในแต่ละสภาวะ ในส่วนของการเติมสารประกอบแมกนีเซียมผลการทดลองก็สอดคล้องกับการศึกษาการผลิต BC โดยใช้ น้ำเชื่อมผลไม้เป็นแหล่งคาร์บอน (Zeng et al., 2011) โดยพบว่าความเข้มข้นของสารประกอบแมกนีเซียมซัลเฟตส่งผลต่อการผลิตเซลลูโลสทางบวก ในช่วงความเข้มข้น 0.4-0.8 กรัม/ลิตร ซึ่งหากเพิ่มความเข้มข้นที่สูงกว่านี้ จะไม่ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียเซลลูโลส ทั้งนี้ปัจจัยจากการเติมองค์ประกอบอื่นด้วย ซึ่งมีลักษณะเดียวกับผลการทดลองนี้ที่เมื่อเติมสารประกอบแมกนีเซียมในความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาณแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้จึงไม่ต่างกับการเติมที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เนื่องจากความเข้มข้นอาจเกินช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมไปแล้วได้

รายงานของ Gomes et al. (2013) การเติมกรดซิตริกเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณ BC ในการศึกษาที่พบว่าความเข้มข้นของกรดซิตริกร้อยละ 3 ต่อปริมาตร ให้ปริมาณน้ำหนักแห้งมากถึง 2.49 ± 0.01 กรัม ซึ่งมากกว่าปริมาณ BC ที่มากกว่าน้ำเสียสับปะรดที่ไม่เติมแหล่งอาหาร ($P < 0.05$) และเป็นที่ทราบกันดีว่า เชื้อจุลินทรีย์ *A. xylinum* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดน้ำส้ม หรือกรดแอซิติก ซึ่งจะส่งผลให้การผลิต BC ลดปริมาณลง จากการทดลองเติมกรดแอซิติกลงในน้ำเสียสับปะรดพบว่า น้ำหนักแห้งของ BC ที่ผลิตจากน้ำเสียสับปะรดที่มีการเติมกรดแอซิติกความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้น้ำหนักมากที่สุดคือ 3.65 ± 0.12

กรัม/น้ำเสียสับปะรด 100 มิลลิเมตร ซึ่งมากกว่าที่ผลิตได้จากน้ำเสียสับปะรดที่ไม่มีการเติมแหล่งอาหารถึง 1.15 ± 3.1 กรัม ($P < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาปัจจัยของกรดแอซิติกร่วมกับการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตไบโอเซลลูโลสจากเชื้อ *G. xylinus* CH001 พบว่า การเติมกรดแอซิติกที่ความเข้มข้น 3 กรัม/ลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร หลังบ่มเป็นระยะเวลา 4 วัน ช่วยให้ผลผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้นสูงสุด 1.35 ± 0.06 กรัม/ลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 6.17 เท่า เมื่อเทียบกับการผลิตโดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว (0.21 ± 0.01 กรัม/ลิตร) (Yang et al., 2014) และจากรายงานของ (Alaban, 1962) พบว่าเมื่อเติมกรดแอซิติกลงไปจะช่วยรักษาระดับความเป็นกรดต่างทำให้เชื้อ *A. xylinum* สามารถเจริญเติบโตได้ดี ทั้งยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น เมื่อเติมกรดแอซิติกร้อยละ 1 ช่วยป้องกันการปนเปื้อนของ *Aspergillus* sp. ได้ และเมื่อเพิ่มปริมาณเป็นร้อยละ 2 จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนจาก *Penicillium* sp. และ *Bacillus* sp. ได้ แต่ในทางกลับกัน ปริมาณกรดแอซิติกที่สูงเกินไปก็ส่งผลในทางกลับกันคือทำให้การผลิต BC ลดลง ดังใน Figure 3 เมื่อมีการเติมกรดแอซิติกความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 5 และเมื่อเพิ่มปริมาณกรดแอซิติกเป็นร้อยละ 7 ไม่พบการสร้าง BC เกิดขึ้น (ไม่แสดงผลการทดลอง) ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อ *A. xylinum* ไม่สามารถนำเอาน้ำตาลไปใช้ประโยชน์ได้ จากการออกซิไดส์น้ำตาลเพื่อสร้างกรดแอซิติกแทน (Iguchi et al., 2000)

นอกจากนั้นยังมีการศึกษาการเติมกรดแอสคอร์บิก หรือวิตามินซีลงไปในน้ำเสียจากสับปะรด พบว่าความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้ปริมาณน้ำหนักแห้งเท่ากับ 2.17 ± 0.10 กรัม ($P < 0.05$) แม้ปริมาณน้ำหนักแห้งของ BC ที่ได้จากการเติมกรดแอสคอร์บิกไม่ได้เพิ่มขึ้นจนเห็นได้ชัด แต่พบว่าลักษณะโครงสร้างของ BC ที่ได้มีลักษณะที่ดีสอดคล้องกับที่ (Keshk, 2014) ได้ศึกษาการใช้กรดแอสคอร์บิกมาเป็นส่วนประกอบในอาหารเพื่อเพิ่มผลผลิตเซลลูโลส ด้วยเชื้อ *G. xylinus* 4 สายพันธุ์

พบว่า อิทธิพลของกรดแอสคอร์บิกส่งผลต่อการผลิตและโครงสร้างของเซลลูโลส โดยการเติมกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 จะช่วยส่งเสริมให้การผลิต

เซลลูโลสสูงขึ้นและช่วยลดความเข้มข้นของกรดกลูโคเนกที่เชื้อสร้างขึ้นระหว่างการผลิตเซลลูโลสอีกด้วย

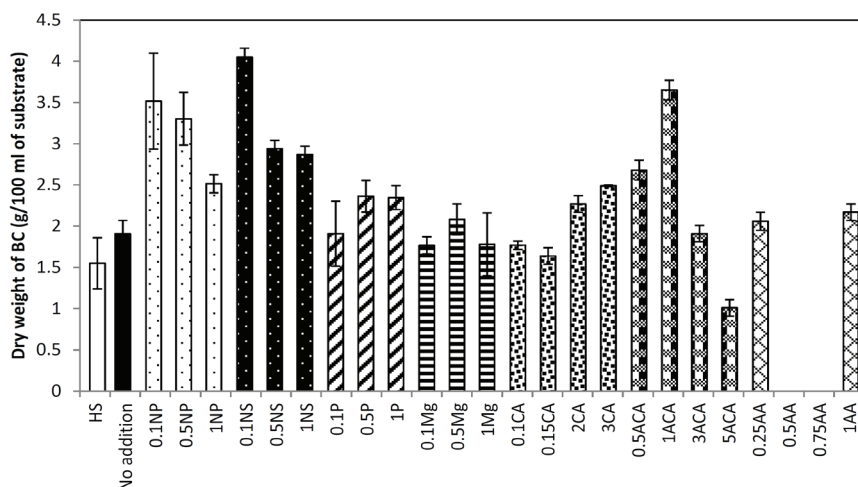


Figure 3 Dry weight of bacterial cellulose produced under different conditions; HS medium (HS), Wastewater from pineapple processing without any addition (No addition), Wastewater from pineapple processing with diammonium phosphate (NP), Ammonium sulfate (NS), Potassium dihydrogen phosphate (P), Magnesium sulfate (Mg), Citric acid (CA), Acetic acid (ACA) and Ascorbic acid (AA) at different concentration (%)

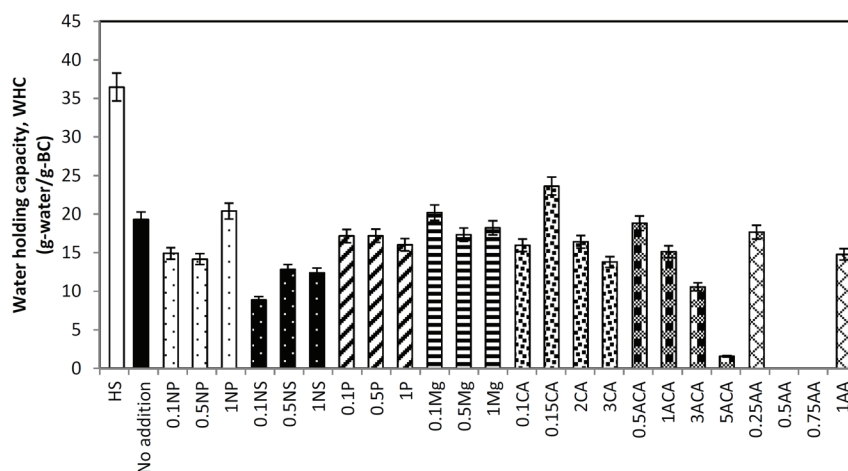


Figure 4 Water holding capacity (WHC) of bacterial cellulose produced under different conditions; HS medium (HS), Wastewater from pineapple processing without any addition (No addition), Wastewater from pineapple processing with diammonium phosphate (NP), Ammonium sulfate (NS), Potassium dihydrogen phosphate (P), Magnesium sulfate (Mg), Citric acid (CA), Acetic acid (ACA) and Ascorbic acid (AA) at different concentration (%)

Figure 4 ที่แสดงค่า water holding capacity, WHC ของเซลลูโลสที่ผลิตจากน้ำเสียจากสับปะรดพบว่าการใช้น้ำสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ได้เส้นใยที่มีค่า WHC น้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ HS ถึงร้อยละ 50 ที่แม้ว่าจะมีการผลิต BC ในปริมาณที่สูงกว่า แต่การเติมกรดซิตริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 โดยปริมาตรสามารถเพิ่มค่า WHC 1.22 เท่าของน้ำเสียสับปะรดโดยที่ไม่เติมสารอาหารเพิ่มเติม การเติมแหล่งไนโตรเจนทั้ง $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ทำให้เกิดเส้นใยมีการเรียงตัวแบบอัดแน่น ซึ่งดูได้จากอัตราส่วนปริมาณน้ำหนักแห้งของ BC ต่อค่า WHC เส้นใยเซลลูโลสที่ได้จากน้ำสับปะรด โดยในภาพรวม

เส้นใยเซลลูโลสจากน้ำเสียสับปะรดจะมีขนาดเล็กและเรียงตัวแน่นกว่าที่ผลิตจากอาหาร HS ดังแสดงใน Figure 5 ซึ่งจากรายงาน (Wu and Liu, 2013) อธิบายไว้ว่าการอุ้มน้ำของเส้นใยที่มีขนาดเล็กของ BC ทำได้เมื่อลักษณะของโครงสร้าง BC มีการจัดเรียงตัวแบบหลวม ๆ ทำให้มีพื้นที่ว่างในการจับกับโมเลกุลของน้ำทำให้ค่า WHC สูง ซึ่ง BC ที่ได้จากการใช้น้ำเสียจากสับปะรดเป็นแหล่งอาหารมีลักษณะโครงสร้างที่หนาแน่น มีพื้นที่ว่างสำหรับโมเลกุลน้ำน้อย ซึ่งสามารถอธิบายค่า WHC ที่ต่ำกว่าของ BC จากน้ำเสียสับปะรดได้

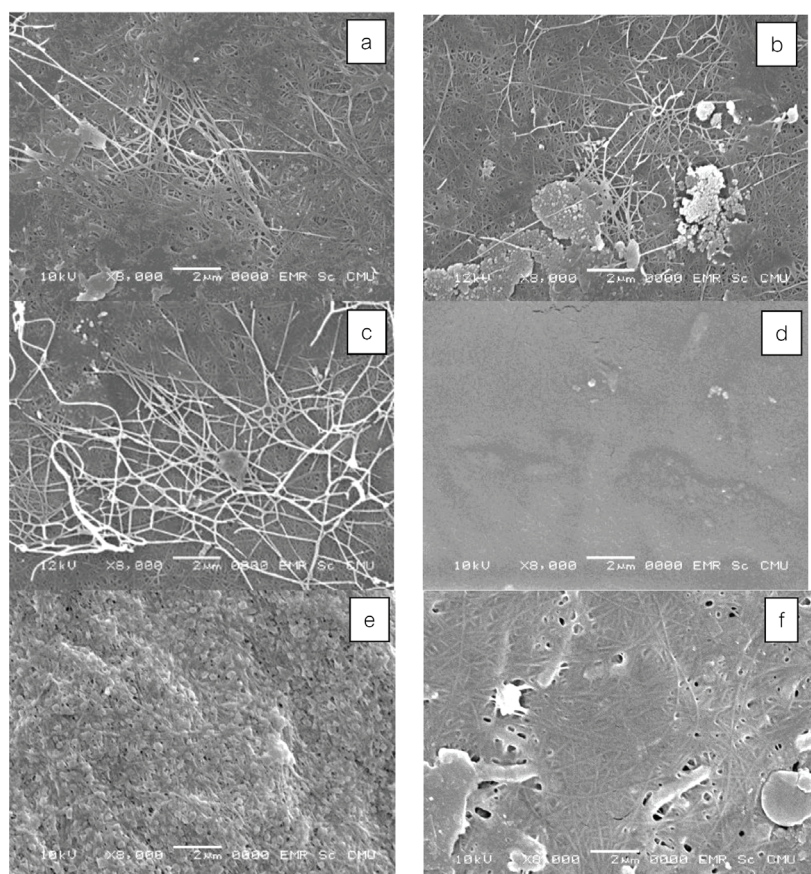


Figure 5 SEM images of bacterial cellulose produced under different conditions HS medium (a), Diammonium phosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (b), Ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (c), Citric acid (d), Potassium dihydrogen phosphate KH_2PO_4 (e) and Acetic acid (f) (all views with 8,000x magnification)

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาแสดงให้เห็นว่าของเสียเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปสับปะรดสามารถนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* ได้ ซึ่งส่งผลให้สามารถลดต้นทุนที่ใช้ในการผลิตได้ โดยน้ำเสียจากสับปะรดที่มีการเติมแหล่งอาหารและไม่เติมแหล่งอาหารให้ปริมาณผลผลิต BC สูงกว่าการใช้อาหาร Hestrin & Scharmm อีกทั้งยังสามารถเพิ่มผลผลิตเซลลูโลสได้โดยการเติมแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม กรดซิทริก กรดแอสติกและกรดแอสคอร์บิก นอกจากนี้การใช้น้ำเสียจากสับปะรดยังให้เส้นใยที่มีความหนาแน่นสูง การศึกษานี้จึงเป็นการเปิดมุมมองใหม่ ๆ ในอนาคตในการศึกษาการใช้ของเสียเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรในการผลิตวัสดุชีวภาพที่มีลักษณะเฉพาะ เช่น เซลลูโลสจากแบคทีเรียซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของเสียเหลือทิ้งและลดต้นทุนการผลิตได้

เอกสารอ้างอิง

- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2557, Available: <https://goo.gl/f8wyXC>. Accessed: March. 3, 2016
- สมน โพรจินทร์. 2552. การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นอาหารสัตว์ ศูนย์สารสนเทศและคณะกรรมการจัดการความรู้กรมปศุสัตว์. Available: <https://goo.gl/yAfKZw>. Accessed: Nov. 24, 2016
- Alaban, C. A. 1962. Studies on the optimum conditions for nata de coco bacterium or nata formation in coconut water. Philippine Agriculturist. 45: 490-516.
- AOAC. 2000. Official Method of Analysis of AOAC International. 17th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Virginia
- Carreira, P., J. A. S. Mendes, E. Trovatti, L. S. Serafim, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre and C. P. Neto. 2011. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. Bioresource Technology. 102: 7354-7360.
- Cheng, K. C., J. M. Catchmark and A. Demirci. 2009. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. J Biol Eng. 3: 12.
- Compendium of Methods for Food Analysis 1st ed, Chapter 2, 2003, p. 2-9, Department of Medical Sciences (DMSc), Thailand
- Dayal, M. S., N. Goswami, A. Sahai, V. Jain, G. Mathur and A. Mathur. 2013. Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter acetii* MTCC 2623. Carbohydrate Polymers. 94: 12-16.
- Esa, F., S. M. Tasirin and N. A. Rahman. 2014. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. Agriculture and Agricultural Science Procedia. 2: 113-119.
- Goelzer, F. D. E., P. C. S. Faria-Tischer, J. C. Vitorino, M. R. Sierakowski and C. A. Tischer. 2009. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. Materials Science and Engineering: C. 29: 546-551.
- Gomes, F. P., N. H. C. S. Silva, E. Trovatti, L. S. Serafim, M. F. Duarte, A. J. D. Silvestre, C. P. Neto and C. S. R. Freire. 2013. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. Biomass and Bioenergy. 55: 205-211.

- Iguchi, M., S. Yamanaka and A. Budhiono. 2000. Bacterial Cellulose: A Masterpiece of Nature's Arts. *Journal of Materials Science*. 35: 261-270.
- Keshk, S. M. A. S. 2014. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydrate Polymers*. 99: 98-100.
- Kongruang, S. 2008. Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* Strains from Agricultural Waste Products. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 148: 245.
- Kurosumi, A., C. Sasaki, Y. Yamashita and Y. Nakamura. 2009. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrate Polymers*. 76: 333-335.
- Li, Z., L. Wang, J. Hua, S. Jia, J. Zhang and H. Liu. 2015. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate Polymers*. 120: 115-119.
- Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
- Pacheco, G., C. R. Nogueira, A. B. Meneguim, E. Trovatti, M. C. C. Silva, R. T. A. Machado, S. J. L. Ribeiro, E. C. da Silva Filho and H. da S. Barud. 2017. Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source. *Industrial Crops and Products*. 107: 13-19.
- Seker, D. C. and N. A. Mohd Zain. 2014. Response surface optimization of glucose production from liquid pineapple waste using immobilized invertase in PVA–alginate–sulfate beads. *Separation and Purification Technology*. 133: 48-54.
- Wu, J.-M. and R.-H. Liu. 2013. Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 115: 284-290.
- Yang, X.-Y., C. Huang, H.-J. Guo, L. Xiong, J. Luo, B. Wang, X.-F. Chen, X.-Q. Lin & X.-D. Chen. 2014. Beneficial Effect of Acetic Acid on the Xylose Utilization and Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Indian Journal of Microbiology*. 54: 268-273.
- Zeng, X., D. P. Small and W. Wan. 2011. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. *Carbohydrate Polymers*. 85: 506-513.