http://journal.rmutp.ac.th/

การผลิตและคุณลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตด้วย *Acetobacter xylinum* TISTR 975 จากน้ำคั้นเปลือกสับปะรด

อดิศักดิ์ จตุรพิรีย์[1]* เอกราชันย์ ไชยชนะ[1] ธนัญญา เสาวภาคย์[1] บงกช ชื่นประไพ[2] และ พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์[2]

[1] ศูนย์วิจัยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและวัสดุชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม

[2] คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

[1] 85 ถนนมาลัยแมน อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

[2] 6 ถนนราชมรรคาใน อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

รับบทความ 29 สิงหาคม 2561 แก้ไขบทความ 26 ตุลาคม 2561 ตอบรับบทความ 6 ธันวาคม 2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 975 โดยใช้น้ำคั้นเปลือกสับปะรด ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกและน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหารและแหล่งคาร์บอน ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิต ได้แก่ เวลา ชนิดของแหล่งคาร์บอน และสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบคุณลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้โดยใช้เครื่องมือ ได้แก่ เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เครื่องวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อน ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิงแคลอริมิเตอร์ และเครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ จากผลการทดลองพบว่าแหล่งอาหารที่เป็นน้ำมะพร้าวจะผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้ปริมาณมากกว่าน้ำคั้นเปลือกสับปะรด โดยใช้ระยะเวลาในการผลิต 10 วัน การเติมน้ำมะพร้าวลงไปในน้ำสับปะรดจะช่วยเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้ แบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้จากสองแหล่งอาหารมีสมบัติใกล้เคียงกัน แต่พบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้จากน้ำคั้นเปลือกสับปะรดจะมีสิ่งปนเปื้อนมากกว่า ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าน้ำคั้นเปลือกสับปะรดสามารถเป็นแหล่งอาหารราคาถูกสำหรับผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส

คำสำคัญ : แบคทีเรียลเซลลูโลส; *Acetobacter xylinum*; เปลือกสับปะรด

** ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทร.: +668 6541 9105, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: adisak_ja@hotmail.com*

http://journal.rmutp.ac.th/

Production and Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum* TISTR 975 from Pineapple Peel Juice

Adisak Jaturapiree[1]* Ekrachan Chaichana[1] Thanunya Saowapark[1]
Bongkot Chuenpraphai[2] and Phimchanok Jaturapiree[2]

[1] Research Center of Agriculture Residue Products and Biomaterials, Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat
[2] Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University
[1] 85 Malaiman Road, Mueang, Nakhon Pathom, 73000
[2] 6 Rajamankha Nai Road, Mueang, Nakhon Pathom, 73000

Received 29 August 2018; Revised 26 October 2018; Accepted 6 December 2018

Abstract

This research studies the production of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* TISTR 975 with pineapple peel juice, a low cost carbon source, and coconut water as nutrient and carbon source. The factors influencing the production were studied including incubation time, type of carbon sources and ratio of mixed carbon sources. In addition, the characteristics of the produced bacterial cellulose were investigated using Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR), Scanning Electron Microscope (SEM), Thermogravimetric Analyzer (TGA), Differential Scanning Colorimeter (DSC) and X-ray Diffractometer (XRD). It was found that the coconut water produced the amount of bacterial cellulose higher than the pineapple peel juice with 10 days of production. An addition of the coconut water into the pineapple peel juice increased the amount of bacterial cellulose. The characteristics of two bacterial celluloses from two different sources were nearly similar but the one from the pineapple peel juice had higher impurities. It can be concluded that the pineapple shell extract could be used as low cost carbon source for bacterial cellulose production.

Keywords : Bacterial Cellulose; *Acetobacter Xylinum*; Pineapple Peel

** Corresponding Author. Tel.: +668 6541 9105, E-mail Address: adisak_ja@hotmail.com*

1. บทนำ

ปัจจุบันพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้รับความสนใจอย่างยิ่ง เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติได้มาจาก เปลือก แกน ของต้นไม้และพืชผักเกือบทุกชนิด แต่การนำไปใช้งานขึ้นรูปผลิตภัณฑ์จากเซลลูโลสยังคงมีปัญหาเนื่องจากจำเป็นที่ต้องแยกเซลลูโลสออกมาจากวัตถุดิบธรรมชาติดังกล่าวก่อนซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงแยกเซลลูโลสออกมาจากส่วนต่างของพืชเพื่อให้ได้เซลลูโลสบริสุทธิ์ที่ร้อยละ 100 โดยส่วนใหญ่เมื่อแยกเซลลูโลสออกมาจะมีส่วนของลิกนิน และ เฮมิเซลลูโลส ปะปนอยู่ด้วยซึ่งทำให้ประสบปัญหาในการควบคุมกระบวนการผลิตและสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สามารถสังเคราะห์เซลลูโลสจากการสร้างของแบคทีเรีย เช่น *Acetobacter, Rhizobium, Agrobacterium* และ *Sarcina* แต่ที่นิยมใช้มากที่สุด ได้แก่ *A. xylinum* เซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียดังกล่าวหรือที่เรียกว่าแบคทีเรียลเซลลูโลส (Bacterial Cellulose) จะมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเหมือนกับเซลลูโลสจากพืช แต่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า เส้นใยที่ได้จะมีขนาดเล็ก มีความเป็นผลึกมีน้ำหนักโมเลกุลสูง อุ้มน้ำได้ดี [1, 2] สามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายๆ อย่าง เช่น สิ่งทอ กระดาษ อาหาร ยา การบำบัดน้ำเสีย ลำโพงคุณภาพดี เป็นต้น [3]

สำหรับการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสนั้นจะต้องมีแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในกระบวนการหมัก ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น กลูโคส ฟลุกโตส ซูโครส มอลโตส ไซโลส กาแลคโตส เป็นต้น [4] แต่เนื่องจากน้ำตาลดังกล่าวมีราคาแพงจึงมีความพยายามในการลดต้นทุนในการผลิตโดยการใช้วัตถุดิบที่หาได้ง่าย เช่น น้ำผลไม้ต่างๆ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำส้ม น้ำองุ่น น้ำแอปเปิ้ล [5-6] น้ำแก้วมังกร [7] น้ำมะม่วง [8] เป็นต้น โดยปัจจุบันในประเทศไทยอุตสาหกรรมการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสส่วนใหญ่จะใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบและแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้มาจะเรียกว่าวุ้นมะพร้าวใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยในปัจจุบันทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมีความพยายามที่จะลดต้นทุนในการผลิตโดยพยายามนำวัตถุดิบที่มีราคาถูกมาใช้เป็นสารตั้งต้น ได้แก่ ของเสียจากอุตสาหกรรม เช่น กากน้ำตาลอ้อย [9] กากน้ำตาลจากหัวบีท [10] น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปสับปะรด [11] กลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล [12] เป็นต้น ของเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น น้ำคั้นยอด ปาล์มน้ำมัน [13] เศษเหลือจากต้นมะม่วงหิมพานต์ [14] เป็นต้น

เมื่อต้องการพิจารณาการนำแบคทีเรียลเซลลูโลสไปประยุกต์ใช้นั้นจำเป็นต้องศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลส โดยแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จะได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์สูตรโครงสร้างทางเคมีโดยการใช้การวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์ เพื่อยืนยันว่าสารที่สังเคราะห์ได้เป็นแบคทีเรียลเซลลูโลส [15] เครื่องมือดังกล่าวนี้ยังสามารถใช้วิเคราะห์แรงอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นภายในโครงสร้างของแบคทีเรียลเซลลูโลส [16] ในการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกของแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยการใช้การวิเคราะห์ด้วยการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์เป็นอีกวิธีหนึ่งในการยืนยันคุณลักษณะของแบคทีเรียลที่ได้ นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์นี้ยังสามารถวิเคราะห์ปริมาณของผลึกของแบคทีเรียลเซลลูโลส ซึ่งความเป็นผลึกและโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จะสามารถใช้ในการอธิบาย เปรียบเทียบสมบัติทางกล สมบัติทางกายภาพ เช่น การละลาย จุดหลอมเหลว การทนสารเคมีของแบคทีเรียลเซลลูโลสได้ [17-18] ส่วนการศึกษาสมบัติด้านความร้อนนั้นก็มีความจำเป็นเช่นเดียวกันในกรณีที่ต้องการประยุกต์ใช้ด้านวัสดุ โดยดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิงแคลอริมิเตอร์จะใช้ในการหาจุดหลอมตัวของผลึก ซึ่งจะถูกนำไปพิจารณาถึงกระบวนการขึ้นรูปโดยการใช้ความร้อน รวมทั้งค่าดังกล่าวยังความสัมพันธ์กับความบริสุทธิ์ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้ [19-20] ส่วน

เครื่องวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อนก็ใช้ในการศึกษาสมบัติเสถียรภาพด้านความร้อนของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้ [14, 21]

สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียลเซลลูโลสในประเทศไทยนั้นจะมุ่งเน้นในส่วนของปริมาณการผลิต และศึกษาสมบัติที่จะประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นในการวิจัยนี้นอกจากจะศึกษาการนำน้ำคั้นจากเปลือกสับปะรดซึ่งจัดเป็นของเหลือใช้ที่มีมากในประเทศไทยมาผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสแล้วยังศึกษาในส่วนของคุณลักษณะสำคัญอื่นของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้ เช่น สมบัติในด้านโครงสร้างเคมี โครงสร้างทางสัณฐานวิทยา สมบัติด้านความร้อน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประยุกต์แบคทีเรียลเซลลูโลสเพื่อใช้ในงานด้านอื่นๆ เช่น พลาสติกชีวภาพ วัสดุในทางการแพทย์ เครื่องสำอาง เป็นต้น โดยในการวิจัยนี้จะมีการนำน้ำมะพร้าวซึ่งสามารถเป็นวัตถุดิบในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในระดับอุตสาหกรรมแล้วมาเปรียบเทียบกับน้ำคั้นเปลือกสับปะรดในทั้งส่วนของปริมาณการผลิตและคุณลักษณะต่างๆ

2. ระเบียบวิธีวิจัย (TPSK 18 ตัวหนา)

2.1 เชื้อจุลินทรีย์และการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อเริ่มต้น

2.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acetobacter xylinum* TISTR 975 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยเชื้อจะเก็บไว้ในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตร น้ำตาลซูโครส 5 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม และกรดอะซิติกร้อยละ 1 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาทั้งหมด 7 วัน จะเกิดแผ่นวุ้นที่ผิวหน้าของอาหาร เก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.2 การเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อเริ่มต้น

เริ่มต้นจากการเตรียมอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ *A. xylinum* TISTR 975 ในอาหาร เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 จากนั้นกระตุ้นการทำงานของเชื้อโดยถ่ายกล้าเชื้อ *A. xylinum* ที่เก็บไว้ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงไปในอาหารที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จะได้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดลองต่อไป

2.2 การเตรียมวัตถุดิบและการวิเคราะห์วัตถุดิบ

2.2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

เปลือกสับปะรดได้จากบริเวณตลาดปฐมมงคล อ.เมืองนครปฐม เปลือกสับปะรดถูกนำมารีดน้ำด้วยเครื่องรีดแบบ 2 ลูกกลิ้ง หลังจากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางแล้วนำไปวิเคราะห์ ส่วนน้ำมะพร้าวจะเป็นน้ำมะพร้าวแก่จากบริเวณตลาดปฐมมงคล อ.เมืองนครปฐม จะถูกนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางแล้วนำไปวิเคราะห์

2.2.2 การวิเคราะห์วัตถุดิบ

นำน้ำคั้นเปลือกสับปะรดและน้ำมะพร้าวมาวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายด้วยเครื่อง Brix Refractometer, วิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก [22], วิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่อง pH Meter, วิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยนำน้ำคั้นเปลือกสับปะรดและน้ำมะพร้าวมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปกรองด้วย Nylon Syringe Filter ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ Rezek RNM Carbohydrate ขนาด 7.8×300 มิลลิเมตร (Phenomenex) ชะด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน ที่อัตราการไหลเท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ

ที่ใช้ในการแยกคือ 45 องศาเซลเซียส และตรวจวัดสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วย Refractive Index (RI) Detector เทียบกับสารมาตรฐาน

2.3 การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส

2.3.1 การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส

ต้มน้ำผลไม้ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำคั้นเปลือกสับปะรด ให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง ตวงให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เทใส่บีกเกอร์ จากนั้นเติมน้ำตาลซูโครส 5 กรัม และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม แล้วเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่ากรดด่างให้ได้ 4.5 ด้วยการเติมกรดอะซิติกร้อยละ 1 โดยปริมาตร หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อ *A. xylinum* ร้อยละ 10 โดยปริมาตร บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้อง โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส เริ่มต้นจากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่มีต่อความหนาของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้ จากนั้นศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ โดยมีการปรับสัดส่วนส่วนผสมระหว่างน้ำคั้นเปลือกสับปะรดกับน้ำมะพร้าว โดยให้มีปริมาตรสุดท้ายรวมเป็น 100 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนระหว่างน้ำคั้นเปลือกสับปะรดต่อน้ำมะพร้าว เป็นดังนี้ 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 และ 0:100 ตามลำดับ

2.3.2 การเก็บเกี่ยวแบคทีเรียลเซลลูโลส

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียลเซลลูโลสตามระยะเวลาที่ต้องการ จึงนำแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาต้มในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ในน้ำกลั่นจนค่า pH ที่ได้มีค่าเท่ากับ 7 นำมาหั่นเป็นแผ่นบางๆ ก่อนนำไปแช่ที่ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dry) ด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปวิเคราะห์คุณลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลสต่อไป

2.4 การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลส

2.4.1 ความหนาและน้ำหนักแห้ง

นำแบคทีเรียลเซลลูโลสผลิตได้และที่ล้างจนมีค่า pH เท่ากับ 7 มาวัดความหนาโดยนำมาผ่ากลางแล้ววัดความหนา 3 จุดมาหาค่าเฉลี่ย หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาชั่งเพื่อหาค่าน้ำหนักแห้ง

2.4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมี

นำแบคทีเรียลเซลลูโลสที่สังเคราะห์ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared (FT-IR) ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ในโหมด transmittance ที่อุณหภูมิห้อง ในช่วงคลื่นตั้งแต่ 4,000-400 cm^{-1} ที่ความละเอียด (Resolution) เท่ากับ 1 cm^{-1}

2.4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะศึกษาด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscopy (SEM) โดยจะนำชิ้นงานมาวางบน Stub จากนั้นนำไปเคลือบด้วยแพลตินัมผสมทองเป็นเวลา 15-30 วินาที จากนั้นจึงนำชิ้นงานไปส่องดูโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา

2.4.4 การศึกษาสมบัติทางความร้อน

การศึกษาสมบัติทางความร้อนจะศึกษาโดยอาศัยเครื่องมือ ได้แก่ Thermogravimetric Analysis (TGA) และDifferential Scanning Colorimeter (DSC) ในการทดสอบการสลายตัวทางความร้อนด้วยเครื่อง TGA ทดสอบที่อุณหภูมิ 50 ถึง 800 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียส

ต่อนาที ในส่วนของการทดสอบการเปลี่ยนแปลงทางความร้อนด้วยเครื่อง DSC จะทดสอบด้วยให้ความร้อนตั้งแต่ 50 ถึง 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที

2.4.5 การศึกษาโครงสร้างและปริมาณผลึก

ศึกษาโครงสร้างและปริมาณผลึกด้วย X-ray Diffraction (XRD) โดยใช้ CuKα แผ่รังสีที่มีความยาวคลื่น 1.5406 A อัตราเร็วในการสแกน 2°/นาที มุมที่ทำการศึกษา 5-40° ที่ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 30 kV ค่า Crystalline Index หรือปริมาณผลึก คำนวณจากการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของส่วนที่เป็นอสัณฐานและส่วนที่เป็นผลึก (XRD Amorphous Substraction Method) [23] ดังสมการที่ (1)

$$\mathrm{CrI}\ (\%) = \left(\frac{A_t - A_{am}}{A_t}\right) \times 100 \qquad (1)$$

โดยที่

A_t = พื้นที่ใต้กราฟส่วนที่เป็นทั้งผลึกและอสัณฐาน

A_{am} = พื้นที่ใต้กราฟเฉพาะส่วนที่เป็นอสัณฐาน

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรแปรวนแบบทางเดียว (One Way ANOVA) กำหนดระดับนัยสำคัญ α= 0.05 และการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแปรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS Version 21

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส

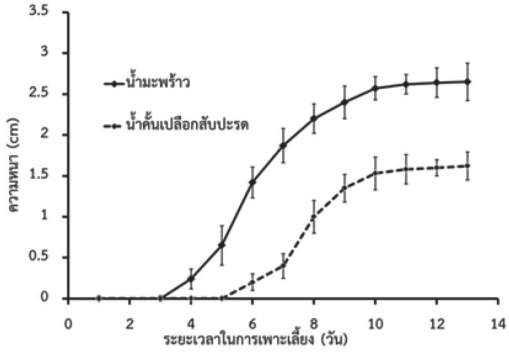
ในขั้นตอนแรกจะเป็นการนำตัวอย่าง ได้แก่ น้ำคั้นเปลือกสับปะรดและน้ำมะพร้าว มาทำการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและองค์ประกอบของตัวอย่างน้ำคั้นเปลือกสับปะรดและน้ำมะพร้าวแสดงดังตารางที่ 1 พบว่า น้ำคั้นเปลือกสับปะรดมีความเป็นกรดมากกว่า รวมทั้งจะมีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าน้ำมะพร้าว แต่เมื่อวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบพบว่า ทั้ง 2 ตัวอย่างจะมีชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่แตกต่างกัน น้ำคั้นเปลือกสับปะรดจะมีน้ำตาลซูโครสอยู่ปริมาณมากที่สุดรองลงมา ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตส ตามลำดับ ส่วนในน้ำมะพร้าวจะมีน้ำตาลฟรุกโตสอยู่ปริมาณมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสและไซโลส ตามลำดับ

ตารางที่ 1 คุณภาพทางเคมีและองค์ประกอบของน้ำคั้นเปลือกสับปะรดและน้ำมะพร้าว

สมบัติ	น้ำคั้นเปลือกสับปะรด	น้ำมะพร้าว
สี	เหลืองอ่อน	ขาว
ความเป็นกรด-ด่าง	4.82	5.26
ของแข็งทั้งหมด (องศาบริกซ์)	14.9	5.5
น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	130.13	30.60
น้ำตาลชนิดต่างๆ (กรัมต่อลิตร)		
กลูโคส	21.29	5.98
ซูโครส	78.76	-
ฟรุกโตส	25.52	13.60
ไซโลส	-	5.86

การศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่มีต่อความหนาของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียจีนัส *Acetobacter xylinum* ที่เลี้ยงในน้ำมะพร้าว, น้ำคั้นเปลือกสับปะรด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 5 กรัมต่อลิตร, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม, กรดอะซิติกร้อยละ 1 โดยปริมาตร และกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28–32 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 1 พบว่า ในช่วงแรกยังไม่มีแบคทีเรียลเซลลูโลสเกิดขึ้น จนกระทั่งเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่งจะมีแบคทีเรียลเซลลูโลสเกิดขึ้นโดยน้ำมะพร้าวจะมีแบคทีเรียลเซลลูโลสเกิดขึ้นหลังจากวันที่ 3 ส่วนน้ำ

คั้นเปลือกสับปะรด จะเริ่มผลิตช้ากว่า โดยจะเริ่มผลิตหลังจากวันที่ 5 เป็นต้นไป หลังจากนั้นในทั้งสองแหล่งคาร์บอนแบคทีเรียจะเริ่มผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้ลดลงและคงที่หลังจากวันที่ 10 เนื่องจากเกิดแบคทีเรียลเซลลูโลสบนผิวหน้าของอาหารมากเกินไป ทำให้เชื้อที่อยู่ด้านล่างไม่สามารถนำออกซิเจนมาใช้ได้ จึงส่งผลให้ไม่สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสเพิ่มขึ้นได้อีก [24]



รูปที่ 1 ผลของเวลาในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส

นอกจากนี้จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำคั้นจากเปลือกสับปะรดสามารถเป็นแหล่งอาหารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อได้ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับน้ำมะพร้าวพบว่าน้ำคั้นเปลือกสับปะรดผลิตเซลลูโลสได้น้อยกว่าถึงแม้ว่ามีปริมาณน้ำตาลมากกว่าก็ตาม อาจจะเนื่องจากสารอาหารและแร่ธาตุที่มีน้ำมะพร้าวมีความเหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีกว่าคั้นจากเปลือกสับปะรด [5] โดยได้มีนักวิจัยพบว่านอกจากปริมาณของน้ำตาลจะมีผลต่อการผลิตแล้ว ชนิดของน้ำตาลก็มีผลด้วย เช่น ไซโลสจะยับยั้งการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส [25] ส่วนวัตถุดิบที่เป็นซูโครสจะผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้ดีกว่า กลูโคส และ แมนนิทอล [18] เป็นต้น ส่วนแร่ธาตุฟอสฟอรัส และ แมกนีเซียม จะส่งเสริมในการผลิต [25, 26] กรดแอสคอบิคช่วยส่งเสริมการผลิต [26] เป็นต้น

การศึกษาความสามารถในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสของแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* โดยมีการปรับสัดส่วนระหว่างน้ำคั้นเปลือกสับปะรดกับน้ำมะพร้าว โดยมีปริมาตรสุดท้ายรวมเป็น 100 มิลลิลิตร ก่อนที่จะเติมน้ำตาลซูโครส, แอมโมเนียมซัลเฟต, กรดอะซิติกและกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาวัด ความหนาและน้ำหนักของแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลส ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสที่มากที่สุดที่วิเคราะห์จากทั้งความหนาและน้ำหนักที่ได้พบว่าที่อัตราส่วนระหว่างน้ำคั้นเปลือกสับปะรดกับน้ำมะพร้าว (20:80) และ ที่ใช้น้ำมะพร้าวเพียงอย่างเดียว (อัตราส่วน 0:100) จะให้ปริมาณการผลิตสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อมีการเติมน้ำมะพร้าวลงไปในน้ำสับปะรด จะทำให้แบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้มีแนวโน้มที่สูงขึ้นซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมน้ำมะพร้าวลงใปในน้ำสับปะรดจะช่วยส่งเสริมปริมาณการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส เนื่องจากในน้ำมะพร้าวมีสารอาหารและแหล่งคาร์บอนที่จำเป็น [5, 27] ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับหลายๆ งานวิจัยที่มีการเติมน้ำมะพร้าวลงไปในแหล่งคาร์บอนอื่น [7, 13, 28]

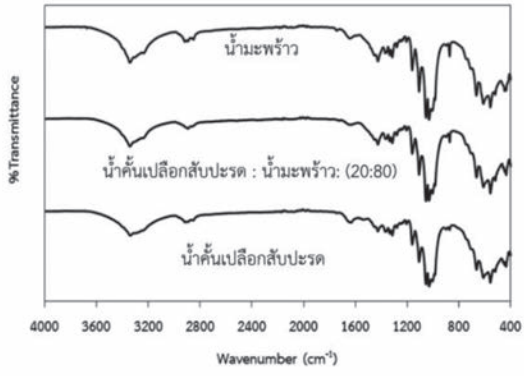
ตารางที่ 2 ปริมาณการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากน้ำคั้นเปลือกสับปะรดและน้ำมะพร้าว เมื่อทำการผลิต 10 วัน

อัตราส่วนโดยปริมาตร (น้ำคั้นเปลือกสับปะรด : น้ำมะพร้าว)	ความหนา (เซนติเมตร)	น้ำหนัก (กรัม)
100 : 0	1.53 ± 0.05^{a}	0.75 ± 0.02^{a}
80 : 20	2.07 ± 0.05^{b}	0.86 ± 0.02^{b}
60 : 40	$2.47 \pm 0.15^{c,d}$	1.13 ± 0.05^{c}
40 : 60	2.43 ± 0.15^{c}	1.00 ± 0.06^{d}
20 : 80	2.76 ± 0.17^{e}	1.50 ± 0.06^{e}
0 :100	$2.65 \pm 0.10^{d,e}$	1.43 ± 0.04^{e}

หมายเหตุ ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้ง คือ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$

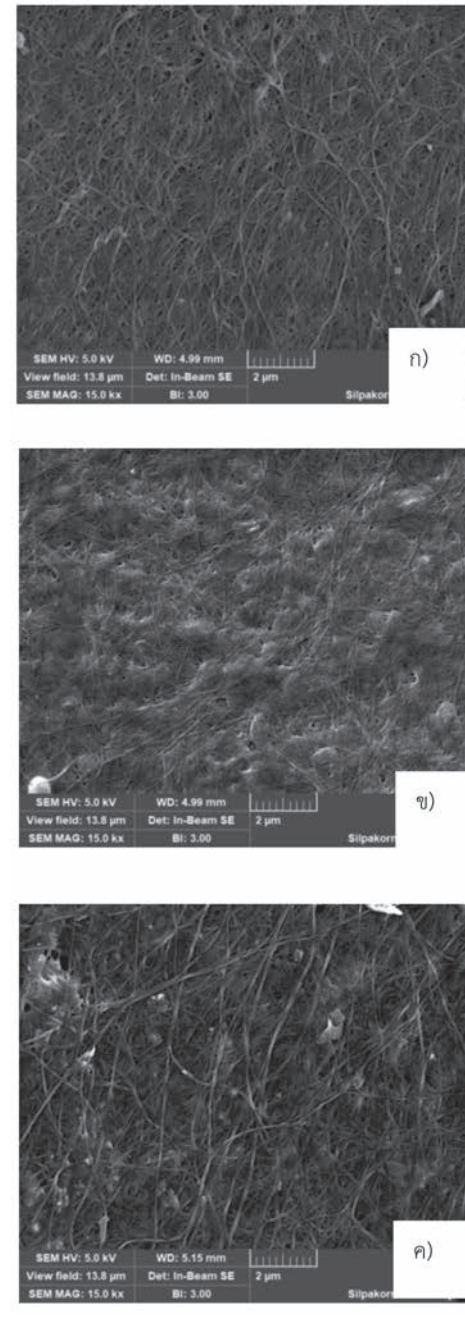
3.2 คุณลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลส

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของตัวอย่างของแข็งที่ผลิตจากน้ำคั้นเปลือกสับปะรดและน้ำมะพร้าวโดยใช้ Fourier Transforms Infrared Spectrometer แสดงในรูปที่ 2 จากสเปคตรัมที่ปรากฏของทั้งตัวอย่างที่ผลิตจากน้ำคั้นเปลือกสับปะรดและน้ำมะพร้าว มีลักษณะคล้ายกันแสดงว่ามีโครงสร้างทางเคมีเหมือนกัน รวมทั้งพีคสำคัญที่พบจะสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของแบคทีเรียลเซลลูโลส [15, 29] จึงสามารถสรุปได้ว่า ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เป็นแบคทีเรียลเซลลูโลส โดยพีคที่สำคัญ ได้แก่ ที่ตำแหน่งความถี่ 3300 (O-H Stretching) 2900 (C-H Strengthing) 1650 (O-H Bending of Absorp Water) 1330 (C-H Stretching) 1160 (C-O-C Stretching) 1110-1060 (C-O-H Stretching) 664-610 (O-H Out of Plane Bending)

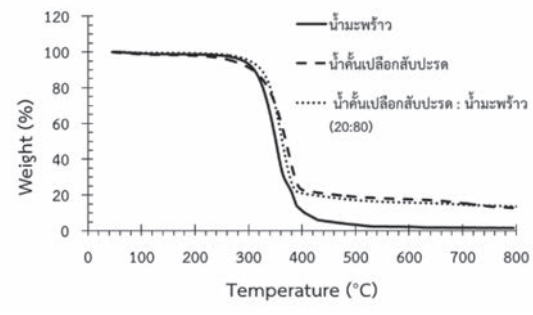


รูปที่ 2 สเปคตรัมของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้

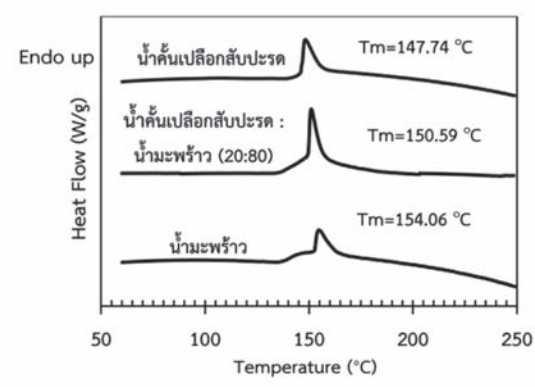
จากการศึกษาโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาแสดงดังรูปที่ 3 พบว่าโครงสร้างของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากทั้ง 3 แหล่งคาร์บอน มีโครงสร้างที่คล้ายกัน โดยจะมีโครงสร้างเป็นแผ่นร่างแหที่เกิดจากเส้นใยจำนวนมากซ้อนทับกัน โดยจากหลายๆ งานวิจัยก็พบในผลการทดลองในลักษณะเช่นเดียวกัน [24, 30] แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกันพบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากน้ำมะพร้าวเส้นใยจะกระจายแยกตัวสานกันเป็นแผ่นสม่ำเสมอและผิวค่อนข้างเรียบ ส่วนแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากน้ำคั้นสับปะรด และจากน้ำคั้นเปลือกสับปะรดผสมกับน้ำมะพร้าวพบว่าจะมีการกระจายตัวของเส้นใยไม่ดี ผิวขรุขระ และมีสิ่งปนเปื้อน (Impurities)



รูปที่ 3 ภาพ SEM ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จาก ก) น้ำมะพร้าว ข) น้ำคั้นเปลือกสับปะรด ค) น้ำคั้นเปลือกสับปะรด : น้ำมะพร้าว: (20:80)



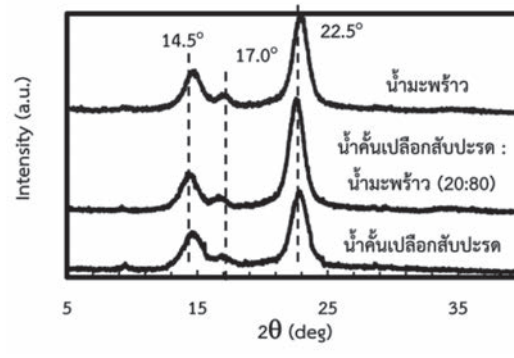
รูปที่ 4 TGA เทอร์โมแกรมของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้



รูปที่ 5 DSC เทอร์โมแกรมของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้

เมื่อนำแผ่นเซลลูโลสที่ได้มาศึกษาความเสถียรทางความร้อนด้วย TGA แสดงดังรูปที่ 4 พบว่า ทั้งสามตัวอย่างมีการสลายตัวที่ใกล้เคียงกันโดยน้ำมะพร้าว น้ำมะพร้าวผสมน้ำคั้นเปลือกสับปะรด และน้ำคั้นเปลือกสับปะรด มีค่าการสลายทางความร้อนที่อุณหภูมิ 352, 362 และ 369 องศาเซลเซียส ตามลำดับซึ่งก็ใกล้เคียงกับงานวิจัยอื่นๆ [14, 31] นอกจากนี้เมื่อศึกษาพฤติกรรมการสลายตัวพบว่า ทั้ง 3 ตัวอย่างจะแสดงพฤติกรรมคล้ายกันดังนี้ โดยจะเกิดการสลายตัว 2 ช่วง ช่วงแรกที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นการสลายตัวของน้ำที่อยู่ในเนื้อวัสดุ หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจะเริ่มเกิดการสลายตัวช่วงที่สองอีกโดยจะเริ่มที่อุณหภูมิประมาณ 300-400 องศาเซลเซียส การสลายตัวที่เกิดขึ้นในช่วงนี้นั้นมีหลายปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องด้วย อาทิเช่น Depolymerization Dehydration การสลายตัวของหน่วยย่อย Glycosyl ที่ต่อมาจะเกิดเป็นถ่านชาร์ [14] นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำคั้นสับปะรดและน้ำคั้นสับปะรดผสมน้ำมะพร้าวมีปริมาณถ่านชาร์จำนวนมากกว่าน้ำมะพร้าว ซึ่งน่าจะมีผลมาจากสารปนเปื้อนที่พบแบคทีเรียลเซลลูโลสที่พบในแหล่งคาร์บอนทั้งสอง เป็นตัวเริ่มต้นและกระตุ้นให้เกิดถ่านชาร์ [21]

จากผลการศึกษาสมบัติทางความร้อนของแบคทีเรียลเซลลูโลสด้วยเทคนิค DSC โดยเพิ่มอุณหภูมิจากอุณหภูมิ 50 ถึงอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที แสดงดังรูปที่ 5 พบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากทั้ง 3 แหล่งคาร์บอน จะปรากฏพีคการดูดความร้อนที่อุณหภูมิตั้งแต่ 147-154 องศาเซลเซียส ซึ่งพีคที่ปรากฏนั้นเป็นพีคที่เกิดจากความร้อนเข้าไปหลอมตัวผลึก หรืออาจเรียกอุณหภูมินี้ว่าอุณหภูมิการหลอมตัว (Melting Point Temperature, Tm) ซึ่งค่าที่ได้ก็สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่ทดสอบสมบัติดังกล่าวของแบคทีเรียลเซลลูโลส [20, 32] นอกจากนี้จะพบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากน้ำคั้นสับปะรดและน้ำคั้นสับปะรดผสมกับน้ำมะพร้าวมีค่า Tm ต่ำกว่าน้ำมะพร้าวนั้นก็อาจจะเป็นผลของสิ่งปนเปื้อนในแบคทีเรียลเซลลูโลส โดยได้เคยมีรายงานว่าสิ่งปนเปื้อนในแบคทีเรียลเซลลูโลสจะทำให้ค่า Tm ต่ำลง [19]



รูปที่ 6 XRD Pattern ของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้

จากผลการทดสอบ XRD ของฟิลม์แบคทีเรียลเซลลูโลสดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่า XRD Pattern ของแบคทีเรียลที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 แหล่งคาร์บอนจะพบพีคที่ตำแหน่ง 2Ø เท่ากับ 14.5°, 17.0° และ 22.5° ซึ่งจะตรงกับระบบผลึกของระนาบ 101 (บริเวณอสัณฐาน) 101 (บริเวณอสัณฐาน) และ 200 (บริเวณผลึก) นอกจากนี้การปรากฏของทั้งสามพิคแสดงให้เห็นแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้เป็นแบบชนิด Iα (Triclinic) ซึ่งจะแตกต่างจากเซลลูโลสที่ได้จากธรรมชาติที่เป็นแบบชนิด Iα (Monoclinic) [33-34] และเมื่อพิจารณาปริมาณของผลึกพบว่าปริมาณผลึกของน้ำคั้นสับปะรด น้ำคั้นสับปะรดผสมกับน้ำมะพร้าว และน้ำมะพร้าวมีค่าเท่ากับร้อยละ 61.67, 69.88 และ 71.89 ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าน้ำคั้นเปลือกสับปะรดมีปริมาณผลึกน้อยที่สุด ซึ่งอาจชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากน้ำคั้นสับปะรดนอกจากจะมีสิ่งปนเปื้อนอยู่ในโครงสร้างแล้ว ยังมีปริมาณผลึกในโครงสร้างน้อยกว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากน้ำมะพร้าว

4. สรุป

สรุปจากการทดลองผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 975 โดยใช้น้ำคั้นเปลือกสับปะรดและน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหารพบว่าน้ำคั้นเปลือกสับปะรดสามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้แต่ในปริมาณที่น้อยกว่าน้ำมะพร้าว นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมน้ำมะพร้าวลงไปในน้ำสับปะรดจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตได้ ส่วนคุณลักษณะของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากน้ำคั้นสับปะรดจะมีลักษณะคล้ายกับที่ได้จากน้ำมะพร้าว นอกจากนี้พบว่าแบคที่เรียเซลลูโลสที่ได้จากน้ำคั้นสับปะรดจะมีสิ่งปนเปื้อนปะปนอยู่ซึ่งจะส่งผลต่อสมบัติบ้าง แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ก็สามารถสรุปได้ว่าน้ำคั้นเปลือกสับปะรดสามารถเป็นแหล่งคาร์บอนที่ราคาถูกและสามารถนำมาผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้ นอกจากนี้จากสมบัติความเป็นผลึกที่สูงของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้ จึงอาจจะเป็นไปได้ในการประยุกต์แบคทีเรียลเซลลูโลสนี้ไปในด้านเทคโนโลยีวัสดุ เช่น เป็นตัวเสริมแรงในพลาสติกชีวภาพ นำไปเป็นสารตัวเติมสำหรับกระดาษ เป็นแผ่นฟิลม์สำหรับบรรจุภัณฑ์ นอกจากนี้สมบัติความเสถียรที่อุณหภูมิสูงของแบคทีเรียลอาจนำมาใช้เป็นตัวรองรับตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์สารเคมีได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐมในการสนับสนุนงบประมาณในการวิจัย สาขาวิชาเคมีและสาขาวิชาฟิสิกส์คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพและภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ในการสนับสนุนเครื่องมือในการวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

[1] R. Jonas and L. F. Farah, “Production and application of microbial cellulose,” *Polymer Degradation and Stability*, vol. 59, pp. 101-106, 1998.

[2] H. C. Huang, L. C. Chen, S.B. Lin, C. P Hsu and H. H. Chen, “In situ modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation,” *Bioresource Technology*, vol. 15, pp. 6084-6091, 2010.

[3] S.-P. Lin, C. I. Loira, J. M. Catchmark, J.-R. Liu, A. Demirci and K.-C. Cheng, “Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose,” *Cellulose*, vol. 20, pp. 2191-2219, 2013.

[4] E. P. Çoban and H. Biyik, “Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose

synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5," *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 27, pp. 5346-5354, 2011.

[5] A. Kurosumi, C. Sasaki, Y. Yamashita and Y. Nakamura, "Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693," *Carbohydrate Polymers*, vol. 76, pp. 333–335, 2009.

[6] M. Wichitta, K. Pichamol, S. Suwanna, P. Kullanan, A. Chutima, P. Jantima and L. Surasak, "Production of Bacterial Cellulose by *Acetobacter xylinum* TISTR086 using Agricultural Products as Carbon Sources," *Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning*, vol. 3, pp. 92-97, 2012.

[7] P. Kriangkrai, P. Arunya and S. Wanticha, "Characterization of bacterial cellulose (Nata de coco) from pitaya," *Khon Kaen Agriculture Journal*, vol. 43 Supplement, pp. 917-921, 2015.

[8] P. Chintana, Y. Wanida and K. Julaluk, "A Study of the Optimal Fermentation Conditions for Nata de Coco Production by *Acetobacter xylinum* TISTR 975 from Mango Juice," *KMUTT Research and Development Journal*, vol. 40, pp. 272-281, 2017.

[9] N. Tyagi and S. Suresh, "Production of cellulose from sugarcane molasses using Gluconacetobacter: optimization and characterization," *Journal of Cleaner Production,* vol. 112, pp. 71–80, 2016.

[10] S. M. A. Keshk, M. A. T. Razek and K. Sameshima, "Bacterial Cellulose Production from Beet Molasses," *African Journal of Biotechnology*, vol. 5, pp. 1519-1523, 2006.

[11] C. Moukamnerd, S. Saenchang, A. Krutjan and C. Techapun, "Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* using wastewater from pineapple processing as a carbon source," *Khon Kaen Agriculture Journal*, vol. 46, pp. 581-590, 2018.

[12] E. Tsouko, C. Kourmentza, D. Ladakis, N. Kopsahelis, I. Mandala, S. Papanikolaou, F. Paloukis, V. Alves and A. Koutinas, "Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, pp. 14832-14849, 2015.

[13] K. Chalermkiet, O. Sompong and P. Nantharat, "Cellulose Production from Oil Palm Shoot Juices Felled for Replanting by *Acetobacter xylinum* TISTR 086," in *proceeding of the 54th Kasetsart University Annual Conference*, Thailand, 2016, pp. 102-109.

[14] G. Pacheco, C. R. Nogueira, A. Meneguin, E. Trovatti, C. C. M. Silva, R. Machado, JR. S. Ribeiro, E. C. da Silva Filho and H. Da Silva Barud, "Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source," *Industrial Crops and Products*, vol. 107, pp. 13-19, 2017.

[15] P. Singhsa, R. Narain and M. Manuspiya, "Bacterial cellulose nanocrystals (BCNC) preparation and characterizations from three bacterial cellulose sources, and development of functionalized BCNC as nucleic acid delivery systems," *ACS Applied Nano Materials*, vol. 1, pp. 209-221, 2018.

[16] Z. Li, L. Wang, J. Hua, S. Jia, J. Zhang and H. Liu, "Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*," *Carbohydrate Polymers*, vol. 120, pp. 115-119, 2015.

[17] R. Du, F. Zhao, Q. Peng, Z. Zhou and Y. Han, "Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* isolated from Chinese persimmon vinegar," *Carbohydrate Polymers*, vol. 194, pp. 200-207, 2018.

[18] F. Mohammadkazemi, M. Azin and A. Ashori, "Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media," *Carbohydrate Polymer*, vol. 117, pp. 518–523, 2015.

[19] X. Fan, Y. Gao, W. He, H. Hu, M. Tian, K. Wang and S. Pan, "Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste of citrus peel and pomace using *Komagataeibacter xylinus*," *Carbohydrate Polymers*, vol. 151, pp. 1068-1072, 2016.

[20] N. F. Vasconcelos, J. P. Feitosa, F. M. da Gama, F. K. Andrade, M. S. de Souza Filho, and M. F. Rosa, "Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features," *Carbohydrate Polymers*, vol. 155, pp. 425-431, 2017.

[21] S. Gea, C. T. Reynolds, N. Roohpour, B. Wirjosentono, N. Soykeabkaew and E. Bilotti, "Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process," *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 9105–9110, 2011.

[22] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith, "Colorimetric method for determination of sugars and related substances," *Analytical Chemistry*, vol. 28, pp. 350-356, 1956.

[23] S. Park, J. O. Baker, M. E. Himmel, P. A. Parilla and D. K. Johnson, "Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance," *Biotechnology for Biofuels*, vol. 3, pp. 1-10, 2010.

[24] S. Sheykhnazari, T. Tabarsa, A. Ashori, A. Shakeri and M. Golalipour, "Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics," *Carbohydrate Polymers*, vol. 86, pp. 1187–1191, 2011.

[25] P. Carreira, J. A. S. Mendes, E. Trovatti, L. S. Serafim, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre and C. P. Neto, "Utilization of residues from

agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose," *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 7354–7360, 2011.

[26] F. P. Gomes, 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, "Production of Bacterial Cellulose by Gluconacetobacter sacchari using Dry Olive Mill Residue," *Biomass and Bioenergy,* vol. 55, pp. 205-211, 2013.

[27] M. M. Lapuz, E. G. Gallardo and M. A. Palo, "The nata organism cultural requirements, characteristics and identity," *Philippine Journal of Science*, vol. 96, pp. 91-108, 1967.

[28] C. Kanjana and S. Rutairat, "Development of bacterial cellulose production in molasses by using coconut juice as the nutrient supplement and adding of gelling agent," *RMUTSB Academic journal*, vol. 3, pp. 98-108, 2015.

[29] S. M. Yim, J. E. Song and H. R. Kim, "Production and characterization of bacterial cellulose fabrics by nitrogen sources of tea and carbon sources of sugar," *Process Biochemistry*, vol. 59, pp. 26-36, 2017.

[30] T. Tabarsa, S. Sheykhnazari, A. Ashori, M. Mashkour, and A. Khazaeian, "Preparation and characterization of reinforced papers using nano bacterial cellulose," *International journal of biological macromolecules*, vol. 101, pp. 334-340, 2017.

[31] Y. Jia, X. Wang, M. Huo, X. Zhai, F. Li and C. Zhong, "Preparation and characterization of a novel bacterial cellulose/chitosan bio-hydrogel," *Nanomaterials and Nanotechnology*, vol. 7, pp. 1-8, 2017.

[32] B. Surma-Slusarska, S. Presler and D. Danielewicz, "Characteristics of Bacterial Cellulose Obtained from *Acetobacter xylinum* Culture for Application in Papermaking," *Fibre & Textiles in Eastern Europe*, vol. 16, pp. 108-111, 2008.

[33] W. Czaja, D. Romanovicz and R. M. Brown, "Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture," *Cellulose*, vol. 11, pp. 403–411, 2004.

[34] R. L. Oliveiraa, J. G. Vieirab, H. S. Baruda, R. M. N. Assunçãoc, G. R. Filhob and S. J. L. Ribeiroa, "Synthesis and Characterization of Methylcellulose Produced from Bacterial Cellulose under Heterogeneous Condition," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 26, pp. 1861-1870, 2015.