การศึกษาเบื้องต้นของการผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำผลผักปลังสุก

มณชัย เดชสังกรานนท์[1,*] อมรรัตน์ สีสุกอง[1]
ณรงค์พันธุ์ รัตนปนัดดา[2]

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต กรุงเทพฯ
[2]สาขาวิชาการประกอบการธุรกิจ คณะวิทยาการจัดการ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา กรุงเทพฯ
*Corresponding author e-mail: monchaibiot@hotmail.com

บทคัดย่อ

วุ้นสวรรค์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* มีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส และมีศักยภาพสูงในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ สามารถผลิตได้โดยใช้ผลผลิตทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน ผลผักปลัง (*Basella alba* Linn.) เป็นแหล่งของสารบีทาเลนที่ให้สีม่วงแดง ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีศักยภาพในการนำมาผลิตสีผสมอาหารจากธรรมชาติ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตวุ้นสวรรค์จากผลผักปลังสุก (*Basella alba* Linn.) ทั้งนี้เพื่อเพิ่มสีธรรมชาติในวุ้นสวรรค์และเพิ่มการใช้ประโยชน์จากผลผักปลังสุก ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบว่าน้ำผลผักปลังสุกพันธุ์ขาวประกอบด้วยความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า คาร์โบไฮเดรต และไฟเบอร์ เท่ากับ 96.77, 0.80, 0.01, 0.70, 1.72 และ 0.04 g/100 g ตามลำดับ มีแร่ธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัส และเหล็ก เท่ากับ 31.86, 266.13 และ < 0.50 mg/100 g ตามลำดับ โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตวุ้นสวรรค์ ประกอบด้วยอัตราส่วนน้ำผลผักปลังสุกต่อน้ำมะพร้าวเท่ากับ 3:7 ความเข้มข้น $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.5% (w/v) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 8 °brix โดยให้ปริมาณเซลลูโลสและอัตราการผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 11.41 g/L และ 1.63 g/L/d ตามลำดับ การศึกษาอิทธิพลของความสูงของอาหารเหลว และระยะเวลาในการหมักต่อการผลิตวุ้นสวรรค์ พบว่าการหมักที่ความสูงของอาหารเหลวเท่ากับ 4.2 เซนติเมตร นาน 10 วัน ให้อัตราการผลิตเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 1.70 g/L/d การต้มเดือดนาน 5, 10 และ 15 นาที และการแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 นาน 48 ชั่วโมง ส่งผลให้ค่า a* (ค่าสีแดง) และค่าแรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่านลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการทดสอบ ในขณะที่การแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 7 วัน ส่งผลต่อค่า a* และแรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่านเพียงเล็กน้อย จากงานวิจัยนี้พบว่าผลผักปลังสุกมีศักยภาพในการนำไปผลิตเป็นวุ้นสวรรค์แต่จำเป็นต้องผสมกับน้ำมะพร้าวในอัตราส่วนที่เหมาะสม

คำสำคัญ : การหมัก/ ผักปลัง/ วุ้นสวรรค์/ *Acetobacter xylinum*

Preliminary Study of Bacterial Cellulose Production from the Ripe Ceylon Spinach (*Basella alba* Linn.) Juice

Monchai Dejsungkranont[1,*] Amornrat Srisukong[1]
Narongphan Rattanapanadda[2]

[1]Biology Program, Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University, Bangkok
[2]Department of Entrepreneurship, Faculty of Management Science, Suan Sunandha Rajabhat University, Bangkok
[*]Corresponding author e-mail: monchaibiot@hotmail.com

Abstract

Bacterial cellulose (BC) is the product from fermentation by *Acetobacter xylinum*. The major component of bacterial cellulose is cellulose. It has been given a great attention due to its high potency for many industrial applications using agricultural products as carbon sources. Ceylon spinach fruits (*Basella alba* Linn.) contain a significant level of reddish to violet pigment known as betalain that has antioxidant properties and has been increasingly used as a food colorant. The objective of this study was to investigate the possibility of the bacterial cellulose production from the ripe ceylon spinach (*Basella alba* Linn.) to add natural color to bacterial cellulose and increase the utilization of the ripe Ceylon spinach fruit. The chemical compositions of white ceylon spinach juice were investigated. Moisture, protein, lipid, ash, carbohydrate and fiber were 96.77, 0.80, 0.01, 0.70, 1.72 and 0.04 g/100g, respectively. Elemental analysis indicated that it was composed calcium, phosphorus, and ferrous were 31.86, 266.13 and < 0.50 mg/100g, respectively. The results indicated that the suitable medium for the production of bacterial cellulose comprised the ratio of the ripe ceylon spinach juice and coconut water was 3:7, 0.5% ammonium sulphate and 8°brix total soluble solids (TSS). The highest of cellulose content and the productivity of

cellulose were 11.41 g/L and 1.63 g/L/d, respectively. The two factors (medium lengths and incubation time) on bacterial cellulose production were examined. The results revealed that the highest productivity of cellulose (1.70 g/L/d) was obtained at the medium lengths of 4.2 cm and incubation time of 10 days. The a* value (red color) and hardness of ceylon spinach bacterial cellulose was not resistant to boiling and changes of pH, but freezing storage slightly reduced the a* value and hardness. Therefore, the ceylon spinach juice has the potential to produce the bacterial cellulose, but must be mixed with coconut water at an appropriately ratio.

Keywords: *Acetobacter xylinum*/ bacterial cellulose/ ceylon spinach/ fermentation

บทนำ

ผักปลัง (Ceylon spinach) เป็นไม้เลื้อยล้มลุกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Basella alba* Linn. อยู่ในวงศ์ Basellaceae พบได้ทั่วทุกภูมิภาคของไทย ทั้งชนิดที่มีลำต้นสีเขียว (ผักปลังขาว) และลำต้นสีม่วงแดง (ผักปลังแดง) มีประโยชน์ทางด้านอาหาร เช่น นำยอดมาลวกเป็นผักจิ้ม หรือนำดอกมาทำแกงส้ม ผลผักปลังสุกมีขนาดและรูปร่างคล้ายเมล็ดข้าวโพด มีสีม่วงอมดำฉ่ำน้ำ นิยมใช้แต่งสีอาหารและขนมไทย (คณะทำงานรวบรวมความรู้เกี่ยวกับผักในโครงการหนูรักผักสีเขียว โดยความร่วมมือระหว่างมูลนิธิโตโยต้าประเทศไทย และสถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2545) ใช้ผลิตเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ (สัมพันธ์ และสมภพ, 2544) และผงสีผสมอาหารที่ปลอดภัยกว่าสีสังเคราะห์ (ชื่นนภา และนาฏศจี, 2552; ทัตดาว และคณะ, 2555) ประโยชน์ทางสมุนไพร เช่น แก้ลมพิษ ผื่นคัน แผลไฟไหม้ กลาก ฝี แก้รังแค แก้ท้องผูก ลดไข้ แก้ขัดเบา ใช้เป็นยาระบาย ป้องกันสิวและกระ ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ลดการทำลายของเซลล์ตับ เป็นต้น (Saikia *et al*., 2006; Akhter *et al*., 2008) สารสำคัญที่พบในผักปลัง ได้แก่ สารประกอบฟีนอล แคโรทีนอยด์ กรดไขมัน เพกติน กรดอะมิโน เพปไทด์ และไทรเทอร์พีนแซโพนิน (ชื่นนภา และนาฏศจี, 2552) ผลสุกสีม่วงดำจะเป็นแหล่งของสารกลุ่มบีตาเลน (Betalain) (Azeredo, 2009) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและละลายน้ำได้ดี (นิธิยา, 2545) ที่สำคัญ ได้แก่ สารบีทานิดินมอโนกลูโคไซด์ และอนุพันธ์ต่าง ๆ ของกอมเฟรนีน (Glassgen *et al*., 1993) จะเห็นได้ว่าผักปลังมีประโยชน์ต่อร่างกายและมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพได้หลากหลาย

วุ้นสวรรค์หรือเซลลูโลสจากแบคทีเรีย (Bacterial cellulose; BC) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* และแบคทีเรีย อีกหลายชนิดในจีนัส *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Sarcina ventriculi*, *Salmonella*, *Escherichia* และ *Rhizobium* (Shi *et al*., 2014) จัดเป็นวัสดุชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โครงสร้างเป็นพอลิเมอร์โซ่ตรงที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดบีตา (1⟶4) วุ้นสวรรค์มีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ ได้แก่ มีความบริสุทธิ์สูง มีความเป็นผลึกสูง มีระดับความเป็นพอลิเมอร์สูง มีโครงสร้างระดับนาโน มีความต้านทานแรงดึงมีประสิทธิภาพในการจุน้ำสูง มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Vela´squez-Rian˜o & Bojaca´, 2017)

ปัจจุบันมีการนำวุ้นสวรรค์ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย อาทิ ด้านอาหาร ใช้เป็น

อาหารหวานและอาหารควบคุมน้ำหนัก เพราะมีไฟเบอร์สูงและไม่มีคอเลสเตอรอล (Ross *et al.*, 1991) อีกทั้งยังช่วยป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ โรคหัวใจ และความดันโลหิต (Jagannath *et al.*, 2008) ใช้เป็นสารเพิ่มความหนืดและความคงตัวในผลิตภัณฑ์อาหาร ยา และเครื่องสำอาง (Coeffy & Bell, 1995) และใช้เตรียมบรรจุภัณฑ์อาหาร (Xiao *et al.*, 2012) ด้านความงามใช้ในการผลิตมาส์ก (Bacterial cellulose mask) รักษาความชุ่มชื้นให้กับผิวหน้า (Amnuaikit *et al.*, 2011) ใช้ในการผลิตสครับขัดหน้า (Facial scrub) (Hasan *et al.*, 2012) ด้านการแพทย์ใช้เตรียมเป็นหนังเทียม (Artificial skin) และผ้าพันแผลเพื่อรักษาบาดแผล ใช้เตรียมอวัยวะเทียมต่าง ๆ เช่น หลอดเลือดเทียม (Artificial arteries) และเยื่อเลือกผ่าน (Dialysis membrane) (Klemm *et al.*, 2001; Czaja *et al.*, 2006; Klemm *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012) และใช้ผลิตคอนแทคเลนส์ (Levinson & Glonek, 2010) ด้านสิ่งแวดล้อม ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตพลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) ที่ย่อยสลายได้ง่าย (Awadhiya *et al.*, 2017) นอกจากนี้มีการนำวุ้นสวรรค์ไปผสมกับพอลิไวนิลแอลกอฮอล์เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับพอลิเมอร์ผสม และใช้ในการผลิตเป็นกระดาษลำโพงคุณภาพสูง (Jonas & Farahh, 1998)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักในการเพิ่มการใช้ประโยชน์ผลผักปลังสุกโดยวิธีการหมัก (Fermentation) ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน โดยนำน้ำคั้นจากผลผักปลังสุกมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตวุ้นสวรรค์ ผลสัมฤทธิ์ของงานวิจัยนี้จะช่วยเพิ่มการใช้ประโยชน์ผลผักปลังสุกให้หลากหลายมากขึ้น เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรมีการเพาะปลูกผักปลังเชิงพาณิชย์ นับเป็นการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุ์พืชของไทยไม่ให้สูญหายไป อีกทั้งยังส่งเสริมให้ชุมชนรู้จักเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบในท้องถิ่นและพึ่งพาตนเองได้อย่างครบวงจรและยั่งยืน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำผลผักปลังสุก
2. เพื่อศึกษาอิทธิพลของความสูงของอาหารเหลว และระยะเวลาในการหมักต่อการผลิตวุ้นสวรรค์
3. เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการต้มเดือด ค่าพีเอช และการแช่เยือกแข็งต่อคุณภาพของวุ้นสวรรค์ที่ผลิตได้

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างผลผักปลังสุก

เก็บตัวอย่างผลสุกของผักปลังพันธุ์ขาว ซึ่งมีสีม่วงดำทั่วทั้งผล จากพื้นที่เพาะปลูกในจังหวัดนครปฐม นำมาแยก

ก้านและสิ่งสกปรกออก จากนั้นนำมาล้างน้ำและผึ่งให้แห้งเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเตรียมน้ำผลผักปลังสุก

นำผลผักปลังสุกขั้นต้นมาคั้นน้ำด้วยเครื่องคั้นแยกกาก จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกกากออก จะได้น้ำผลผักปลังสุกเพื่อใช้ทดลองต่อไป

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำผลผักปลังสุกและน้ำมะพร้าว

นำน้ำผลผักปลังสุกขั้นต้นไปวิเคราะห์ความชื้น เถ้า ไขมัน เส้นใย โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต โดยวิธี AOAC (2000) และวิเคราะห์แร่ธาตุโดยใช้เครื่อง Inductively Coupled Plasma (ICP) และวิตามินบางชนิดโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และเปรียบเทียบปริมาณกรดทั้งหมด (วิเคราะห์โดยการไตเตรท) ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (วัดค่าด้วย Hand refractometer) และค่าพีเอช (วัดค่าด้วย pH meter) ระหว่างน้ำผลผักปลังสุกกับน้ำมะพร้าว

4. การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

การทดลองนี้ใช้หัวเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* สำหรับผลิตวุ้นสวรรค์จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการหมัก โดยนำหัวเชื้อดังกล่าวไปขยายปริมาณในอาหารน้ำมะพร้าว ซึ่งประกอบด้วยน้ำมะพร้าว 1 ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] 5 กรัม และน้ำตาลทราย 50 กรัม (สมคิด, 2531) โดยนำอาหารน้ำมะพร้าวไปต้มเดือดนาน 15 นาที รอให้เย็นแล้วเติมกรดอะซิติกเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้น 3% (v/v) จากนั้นเติมหัวเชื้อตั้งต้นปริมาตร 10% (v/v) ผสมให้เข้ากันดี แล้วแบ่งใส่ขวดแก้วทรงสูงที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตรขวดละ 200 มิลลิลิตร จากนั้นปิดปากขวดด้วยจุกสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

5. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสม

จากการทดลองเบื้องต้น (Preliminary) พบว่าการใช้น้ำผลผักปลังสุก 100% เป็นวัตถุดิบในการผลิตวุ้นสวรรค์จะให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมะพร้าวหรือการใช้น้ำผลผักปลังสุกผสมน้ำมะพร้าว ดังนั้นเพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์จากผลผักปลังสุก งานวิจัยนี้จึงใช้น้ำผลผักปลังสุกผสมน้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบในการผลิตวุ้นสวรรค์ โดยหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำผลผักปลังสุกแบบสภาวะนิ่ง (Static culture) โดยผันแปร 1) อัตราส่วนระหว่างน้ำผลผักปลังสุกต่อน้ำมะพร้าว 3 ระดับ (3:7, 5:5 และ 7:3) 2) ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 3 ระดับ (0, 0.3 และ 0.5% w/v) และ 3) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 3 ระดับ (4, 6 และ 8 °brix) โดยออกแบบการทดลองแบบ 3^3 Factorial Design in Completely Randomized Design

(ตารางที่ 1) และทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละครั้งเก็บข้อมูล 2 ครั้ง ทำการวิเคราะห์ข้อมูล Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละชุดการทดลองโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT) การเตรียมอาหารแยกเตรียมทีละสูตร โดยใช้น้ำตาลทรายปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดและวัดค่าด้วย Hand refractometer เมื่อเตรียมอาหารเสร็จนำไปต้มเดือดนาน 15 นาที รอให้เย็นและปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น จากนั้นเติมหัวเชื้อตั้งต้นปริมาณ 10% (v/v) แล้วบรรจุลงขวดแก้วใส (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง × สูง เท่ากับ 8 × 11 เซนติเมตร) ปริมาตรขวดละ 150 มิลลิลิตร จากนั้นคลุมปากขวดด้วยผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เมื่อครบกำหนดเก็บเกี่ยวแผ่นวุ้นสวรรค์ที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพ ดังนี้

1) วิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส ตามวิธีการของ Watanabe & Yamaaaka (1995) โดยนำแผ่นวุ้นสวรรค์มาล้างน้ำให้สะอาดและแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นผึ่งให้สะเด็ดน้ำนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4% (w/v) นาน 20 นาที แล้วล้างน้ำให้สะอาดและแช่ทิ้งไว้ 1 คืน นำแผ่นวุ้นที่ได้ไปแช่ในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5% (v/v) นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้ง จนน้ำล้างมีค่าพีเอชเป็นกลาง (ค่าพีเอชเท่ากับ 7) จากนั้นอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ รายงานผลเป็นปริมาณเซลลูโลส (g/L) และคำนวณหาอัตราการผลิตเซลลูโลส (Cellulose productivity) จากสูตร อัตราการผลิตเซลลูโลส (g/L/d) = น้ำหนักแห้งของแผ่นวุ้น (g)/ระยะเวลาในการหมัก (d) × ปริมาตรอาหาร (L)

2) วัดค่า a* (ค่าสีแดง) ด้วยเครื่องวัดสี (Handy colorimeter)

6. ศึกษาอิทธิพลของระดับความสูงของอาหารเหลวและระยะเวลาในการหมักต่อการผลิตวุ้นสวรรค์

เนื่องจากความสูงของอาหารเหลวและระยะเวลาในการหมักมีอิทธิพลต่อการผลิตวุ้นสวรรค์ (วราวุฒิ และคณะ, 2535) การทดลองขั้นนี้จึงศึกษาอิทธิพลของปัจจัยดังกล่าวต่อการผลิตวุ้นสวรรค์ในระดับถาด (ขนาด กว้าง × ยาว × ลึก เท่ากับ 17.8 × 30.5 × 7.7 เซนติเมตร) และใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากการทดลองขั้นต้นในการผลิต

ตารางที่ 1 การกำหนดปัจจัยในชุดการทดลองแบบ 3^3 Factorial Design in Completely Randomized Design ของการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำผลผักปลังสุก

ชุดการทดลอง	อัตราส่วนน้ำผลผักปลังสุกต่อน้ำมะพร้าว	ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ (%, w/v)	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (°brix)
1	3:7	0	4
2	3:7	0	6
3	3:7	0	8
4	3:7	0.3	4
5	3:7	0.3	6
6	3:7	0.3	8
7	3:7	0.5	4
8	3:7	0.5	6
9	3:7	0.5	8
10	5:5	0	4
11	5:5	0	6
12	5:5	0	8
13	5:5	0.3	4
14	5:5	0.3	6
15	5:5	03	8
16	5:5	0.5	4
17	5:5	0.5	6
18	5:5	0.5	8
19	7:3	0	4
20	7:3	0	6
21	7:3	0	8
22	7:3	0.3	4
23	7:3	0.3	6
24	7:3	0.3	8
25	7:3	0.5	4
26	7:3	0.5	6
27	7:3	0.5	8

โดยศึกษาความสูงของอาหารเหลว 3 ระดับ (3.4, 4.2 และ 5.5 เซนติเมตร; ปริมาตรอาหาร 1, 1.5 และ 2 ลิตร) และระยะเวลาในการหมัก 3 ระดับ (7, 10 และ 14 วัน) โดยออกแบบการทดลองแบบ 2^3 Factorial Design in Completely Randomized Design (ตารางที่ 2) การทำซ้ำและการวิเคราะห์ข้อมูล ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 5 และใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากการทดลองขั้นต้น และใช้หัวเชื้อตั้งต้น 10% (v/v) ทำการหมักในถาดสแตนเลสปลอดสนิมที่ลวกฆ่าเชื้อด้วยน้ำร้อนและคลุมถาดด้วยผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว กำหนดความสูงของอาหารเหลวและระยะเวลาในการหมักของแต่ละชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ตามตารางที่ 2 เมื่อการหมักเสร็จสิ้น เก็บเกี่ยวแผ่นวุ้นสวรรค์มาวิเคราะห์คุณภาพ เช่นเดียวกับข้อ 5 และนำแผ่นวุ้นที่ได้วัดค่าแรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่านด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer/ Stable micro systems TA XT2i/England) โดยใช้หัวเข็มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร

7. ศึกษาผลของระยะเวลาในการต้มเดือด ค่าพีเอช และการแช่เยือกแข็งต่อคุณภาพวุ้นสวรรค์

การทดลองขั้นตอนนี้ดัดแปลงจากวิธีการของ Ng & Shyu (2004) โดยนำแผ่นวุ้นสวรรค์มาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด 2 × 2 × 1 เซนติเมตร แล้วนำไปทดสอบดังนี้

1) ผลของระยะเวลาในการต้มเดือด โดยนำชิ้นวุ้นไปต้มในน้ำเดือดนาน 5, 10 และ 15 นาที

2) ผลของค่าพีเอช โดยนำชิ้นวุ้นไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 3, 4, 5, 6 และ 7 นาน 48 ชั่วโมง

3) ผลของการแช่เยือกแข็ง โดยนำชิ้นวุ้นไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

เมื่อสิ้นสุดการทดสอบนำชิ้นวุ้นที่ได้ไปวิเคราะห์ค่า a* และค่าแรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่านเปรียบเทียบกับก่อนการทดสอบ

ตารางที่ 2 การกำหนดปัจจัยในชุดการทดลองแบบ 2^3 Factorial Design in Completely Randomized Design ของการศึกษาอิทธิพลของระดับความสูงของอาหารเหลวและระยะเวลาในการหมักต่อการผลิตวุ้นสวรรค์

ชุดการทดลอง	ปัจจัยในการผลิต	
	ความสูงของอาหารเหลว (เซนติเมตร)	ระยะเวลาในการหมัก (วัน)
1	3.4	7
2	4.2	7
3	5.5	7
4	3.4	10
5	4.2	10
6	5.5	10
7	3.4	14
8	4.2	14
9	5.5	14

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. องค์ประกอบทางเคมีของน้ำผลผักปลังสุกและน้ำมะพร้าว

น้ำผลผักปลังสุกพันธุ์ขาวมีความชื้นเป็นองค์ประกอบหลักประมาณ 97% (ตารางที่ 3) รองลงมาคือคาร์โบไฮเดรตและเส้นใย ตามลำดับ มีแร่ธาตุฟอสฟอรัสและแคลเซียม เท่ากับ 266.13 และ 31.86 mg/100g ตามลำดับ มีวิตามินเอ เท่ากับ 17.76 units และมีปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับ 1.06% (w/v) ซึ่งมากกว่าน้ำมะพร้าวประมาณ 4.40 เท่า แต่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดและค่าพีเอชใกล้เคียงกับน้ำมะพร้าว (ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่าน้ำผลผักปลังสุกมีศักยภาพที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตวุ้นสวรรค์ เพราะประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของแบคทีเรีย *A. xylinum*

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีบางประการของน้ำผลผักปลังสุกพันธุ์ขาว (*Basella alba* Linn.) และน้ำมะพร้าวแก่ในส่วนที่เป็นของเหลว 100 กรัม

องค์ประกอบทางเคมี	น้ำผลผักปลังสุก	น้ำมะพร้าว
ความชื้น (g)	96.77	-*
โปรตีน (g)	0.80	-
ไขมัน (g)	0.01	-
เถ้า (g)	0.70	-
คาร์โบไฮเดรต (g)	1.72	-
เส้นใย (g)	0.04	-
แคลเซียม (mg)	31.86	-
ฟอสฟอรัส (mg)	266.13	-
เหล็ก (mg)	< 0.50	-
วิตามินเอ (units)	17.76	-
วิตามินบีหนึ่ง (mg)	0.03	-
วิตามินบีสอง (mg)	0.01	-
วิตามินบีสาม (mg)	< 0.072	-
วิตามินซี (mg)	< 0.9	-
ปริมาณกรดทั้งหมด (%, w/v)	1.06	0.24
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (°brix)	3.60	4.00
ค่าพีเอช (pH)	4.75	5.09

หมายเหตุ: * ไม่ได้วิเคราะห์

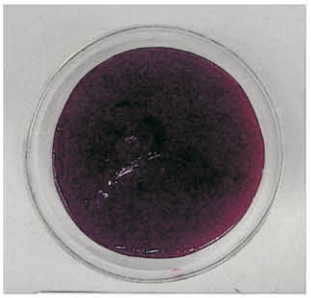
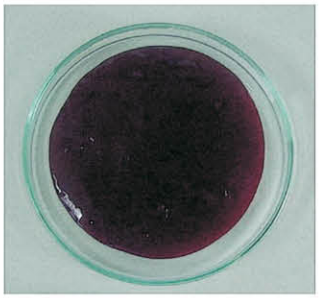
2. สูตรอาหารที่เหมาะสม

ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย *A. xylinum* สามารถเจริญและผลิตเซลลูโลสในอาหารเหลวทั้ง 27 สูตรได้ โดยวุ้นสวรรค์ที่ผลิตได้มีลักษณะเป็นแผ่นลอยอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารและมีสีม่วงอมดำดังตัวอย่างในภาพที่ 1 แผ่นวุ้นมีลักษณะเหนียวและไม่สามารถทำให้ขาดด้วยมือเปล่าได้ ผิวหน้าเรียบและมันวาว เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีออกซิเจนเพียงพอต่อการผลิตเซลลูโลส จึงทำให้เกิดการอัดตัวกันแน่นของเส้นใยเซลลูโลส ในขณะที่อีกด้านหนึ่งซึ่งลอยอยู่ในอาหารเหลว มีลักษณะไม่เรียบและพบชิ้นส่วนของ

เซลลูโลสกระจายตัวอยู่ในอาหารเหลว ทั้งนี้เพราะบริเวณดังกล่าวมีออกซิเจนจำกัด การผลิตเซลลูโลสจึงไม่สมบูรณ์และไม่อัดตัวกันแน่น (เยาวพา, 2546) จากตารางที่ 4 พบว่าชุดการทดลองที่ 9 (อัตราส่วนของน้ำผลผักปลังสุกต่อน้ำมะพร้าวเท่ากับ 3:7 ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.5% (w/v) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 8 °brix) ให้ปริมาณเซลลูโลสและอัตราการผลิตเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 11.41 g/L และ 1.63 g/L/d ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 25 ให้ปริมาณเซลลูโลสและอัตราการผลิตเซลลูโลสต่ำสุดเท่ากับ 2.4 g/L และ 0.34 g/L/d ตามลำดับ

ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการผลิตวุ้นสวรรค์จากแก้วมังกรที่รายงานว่าต้องเติมน้ำมะพร้าวลงไปเพื่อให้ได้ผลผลิตตามต้องการ (เกรียงไกร และคณะ, 2558) และการผลิตวุ้นสวรรค์จากกากน้ำตาล ซึ่งพบว่าผลผลิตจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น $(NH_4)_2SO_4$ และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (อนันต์ และคณะ, 2553) จากการทดลองนี้พบว่าทั้งสามปัจจัยมีอิทธิพลร่วมต่ออัตราการผลิตเซลลูโลสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และพบว่าอัตราส่วนของน้ำผลผักปลังสุกต่อน้ำมะพร้าวมีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตเซลลูโลสมากที่สุด (ไม่ได้แสดงข้อมูล) โดยพบว่าเมื่ออัตราส่วนของน้ำผลผักปลังสุกเพิ่มขึ้นผลผลิตวุ้นสวรรค์จะลดลง เป็นที่ทราบกันดีว่าน้ำมะพร้าวมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการผลิตวุ้นสวรรค์ครบถ้วน โดยมีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 3.7% และมีแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการผลิตวุ้นสวรรค์ (Lapuz & Gallardo, 1967) ในขณะที่น้ำผลผักปลังสุกมีคาร์โบไฮเดรตเพียง 1.72% (ตารางที่ 3) ดังนั้นการเพิ่มอัตราส่วนของน้ำผลผักปลังสุกจึงทำให้สารอาหารจากน้ำมะพร้าวลดลง ผลผลิตของวุ้นสวรรค์จึงลดลงด้วย

โดยทั่วไปเซลล์แบคทีเรียมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 8-10% ดังนั้นการเติมแหล่งไนโตรเจนในรูป $(NH_4)_2SO_4$ จึงช่วยเร่งการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นของ *A. xylinum* แหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปจะเกี่ยวข้องกับยีน *acsAB acsB acsD* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ cellulose synthase (Valla, 1995) ในขณะที่การเติมน้ำตาลทรายจะเป็นการเพิ่มแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญและการผลิตเซลลูโลส มีรายงานว่าน้ำตาลเดกซ์โทรสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ช่วยให้แบคทีเรียสร้างแผ่นวุ้นได้หนาที่สุด รองลงมาคือน้ำตาลทรายหรือน้ำตาลซูโครสซึ่งหาได้ง่ายและราคาถูกกว่า (ทิพรัตน์, 2536)

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 1 ลักษณะของวุ้นสวรรค์ที่ผลิตได้จากอาหารที่ใช้อัตราส่วนของน้ำผลผักปลังสุกต่อน้ำมะพร้าวเท่ากับ (ก) 3:7, (ข) 5:5 และ (ค) 7:3

ตารางที่ 4 ผลของสูตรอาหารที่แตกต่างกันต่อปริมาณเซลลูโลส อัตราการผลิตเซลลูโลส และค่า a* ของแผ่นวุ้นสวรรค์

ชุดการทดลอง*	ปริมาณเซลลูโลส (g/L)	อัตราการผลิตเซลลูโลส (g/L/d)	ค่า a* (ค่าสีแดง)
1	$6.60^{efg}\pm0.05$	$0.94^{efg}\pm0.05$	$47.06^{hijklm}\pm2.29$
2	$5.00^{def}\pm0.04$	$0.71^{def}\pm0.04$	$47.39^{ghijkl}\pm2.98$
3	$8.90^{bc}\pm0.09$	$1.27^{bc}\pm0.09$	$49.25^{defghi}\pm0.82$
4	$6.50^{efg}\pm0.04$	$0.93^{efg}\pm0.04$	$46.04^{jklmn}\pm0.92$
5	$7.60^{cde}\pm0.05$	$1.08^{cde}\pm0.05$	$46.04^{jklmn}\pm0.39$
6	$8.33^{cd}\pm0.01$	$1.19^{cd}\pm0.01$	$48.1^{fghijk}\pm0.96$
7	$6.23^{efgh}\pm0.02$	$0.89^{efgh}\pm0.02$	$52.93^{bc}\pm1.38$
8	$10.15^{ab}\pm0.09$	$1.45^{ab}\pm0.09$	$54.40^{ab}\pm0.86$
9	$11.41^{a}\pm0.15$	$1.63^{a}\pm0.15$	$55.96^{a}\pm1.85$
10	$4.00^{jk}\pm0.02$	$0.57^{jk}\pm0.02$	$44.06^{nop}\pm1.47$
11	$7.50^{cde}\pm0.10$	$1.07^{cde}\pm0.10$	$45.35^{lmno}\pm1.52$
12	$6.23^{efgh}\pm0.34$	$0.89^{efgh}\pm0.34$	$45.23^{lmno}\pm2.17$
13	$3.71^{kl}\pm0.07$	$0.53^{kl}\pm0.07$	$46.76^{ijklm}\pm0.75$
14	$5.32^{ghij}\pm0.03$	$0.76^{ghij}\pm0.03$	$51.05^{cde}\pm1.17$
15	$5.60^{fghi}\pm0.08$	$0.80^{fghi}\pm0.08$	$50.16^{def}\pm0.89$
16	$7.42^{cde}\pm0.03$	$1.06^{cde}\pm0.03$	$50.07^{defg}\pm1.65$
17	$10.10^{ab}\pm0.06$	$1.44^{ab}\pm0.06$	$49.67^{defgh}\pm1.97$
18	$9.73^{c}\pm0.26$	$1.39^{c}\pm0.26$	$52.80^{bc}\pm1.08$

ชุดการทดลอง*	ปริมาณเซลลูโลส (g/L)	อัตราการผลิตเซลลูโลส (g/L/d)	ค่า a* (ค่าสีแดง)
19	7.00^{def}±0.07	1.00^{def}±0.07	42.68^{q}±1.12
20	4.62^{ijk}±0.08	0.66^{ijk}±0.08	42.77^{opq}±1.18
21	4.90^{hijk}±0.05	0.70^{hijk}±0.05	43.46^{pq}±0.80
22	3.43^{kl}±0.17	0.49^{kl}±0.17	44.43^{mnop}±1.78
23	4.41^{ijk}±0.07	0.63^{ijk}±0.07	45.54^{klmn}±0.91
24	4.90^{hijk}±0.01	0.70^{hijk}±0.01	48.39^{defghi}±0.93
25	2.40^{l}±0.09	0.34^{l}±0.09	49.20^{defghi}±0.71
26	4.70^{ijk}±0.05	0.67^{ijk}±0.05	49.02^{defghi}±1.45
27	4.70^{ijk} ±0.04	0.67^{ijk}±0.04	51.43^{cd}±0.71

หมายเหตุ: * การกำหนดปัจจัยของแต่ละชุดการทดลองดูในตารางที่ 1, $^{a,b,c,d,e...}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลผักปลังสุกมีสีม่วงอมดำซึ่งเกิดจากรงควัตถุกลุ่มบีตาเลน (Betalain) เช่นเดียวกับที่พบในบีทรูท แก้วมังกร และดอกเฟื่องฟ้า (Azeredo, 2009) เมื่อพิจารณาค่า a* ซึ่งแสดงถึงความเป็นสีแดง พบว่าทั้งสามปัจจัยมีอิทธิพลต่อค่า a* ของแผ่นวุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่พบอิทธิพลร่วมของทั้งสามปัจจัยและพบว่าค่า a* มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณเซลลูโลสและอัตราการผลิตเซลลูโลส (ไม่ได้แสดงข้อมูล) โดยชุดการทดลองที่ 9 ให้แผ่นวุ้นที่มีค่า a* สูงสุดเท่ากับ 55.96 (ตารางที่ 4) เนื่องจากสารกลุ่มบีตาเลนเป็นรงควัตถุที่ให้สีม่วงดำในน้ำผลผักปลังสุก ดังนั้นสภาวะที่มีการผลิตเซลลูโลสสูงจึงส่งเสริมให้มีการแทรกตัวของสารดังกล่าวไปยังเส้นใยเซลลูโลสมากขึ้น เป็นผลให้ค่า a* ของแผ่นวุ้นมีค่าสูงตามไปด้วย

จากผลการทดลองขั้นต้นแสดงให้เห็นว่าน้ำผลผักปลังสุกมีศักยภาพในการผลิตวุ้นสวรรค์ ซึ่งนอกจากจะเป็นแหล่งของธาตุอาหารและวิตามินสำหรับการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของแบคทีเรีย *A. xylinum* แล้ว ยังให้แผ่นวุ้นที่มีสีสันสวยงาม โดยผู้วิจัยได้คัดเลือกสูตรอาหารในชุดการทดลองที่ 9 (อัตราส่วนของน้ำผลผักปลังสุกต่อน้ำมะพร้าวเท่ากับ 3:7, ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.5% (w/v), ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 8 °brix) ไปทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากให้ผลผลิตของเซลลูโลสสูงสุดและแผ่นวุ้นมีค่า a* สูงสุด

3. อิทธิพลของระดับความสูงของอาหารเหลวและระยะเวลาในการหมักต่อการผลิตวุ้นสวรรค์

เนื่องจาก *A. xylinum* เป็นแบคทีเรียชนิดเคโมออร์แกโนโทรฟ (Chemoorganotroph) จึงต้องใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในการหายใจ ดังนั้นการผลิตวุ้นสวรรค์แบบสภาวะนิ่ง ปริมาณออกซิเจนจึงถูกจำกัดโดยแผ่นวุ้นที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เพราะการถ่ายโอนออกซิเจนระหว่างบรรยากาศกับผิวหน้าของอาหารลดลง (Dudman, 1960) ด้วยเหตุนี้จึงนิยมใช้ภาชนะปากกว้างในการหมักวุ้นสวรรค์ นอกจากนี้เซลลูโลสที่สร้างขึ้นยังดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ไว้ภายใน เป็นผลให้แบคทีเรียใช้ออกซิเจนได้น้อยลง (Schramn & Hestrin, 1954) อย่างไรก็ตามหากมีออกซิเจนมากเกินไปจะทำให้กลูโคสถูกออกซิเดชันโดยเอนไซม์ dehydrogenase เกิดเป็นกรดกลูโคนิกซึ่งจะทำให้การผลิตเซลลูโลสลดลง (Asai, 1968; Hwang *et al*., 1999) ดังนั้นเมื่อมีปริมาณสารอาหารเพียงพอและมีปริมาณออกซิเจนเหมาะสมแบคทีเรียจะมีการผลิตเซลลูโลสได้อย่างรวดเร็ว

จากการทดลองพบว่าระดับความสูงของอาหารเหลวและระยะเวลาในการหมักมีอิทธิพลร่วมต่อการผลิตเซลลูโลสและค่า a* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากตารางที่ 5 และภาพที่ 2 พบว่าเมื่อความสูงของอาหารเหลวเพิ่มจาก 3.4 เซนติเมตร เป็น 4.2 เซนติเมตร อัตราการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความสูงของอาหารเหลวเป็น 5.5 เซนติเมตร อัตราการผลิตเซลลูโลสลดลง โดยชุดการทดลองที่ 5 (ความสูงของอาหารเหลวเท่ากับ 4.2 เซนติเมตร ใช้เวลาในการหมักนาน 10 วัน) ให้ปริมาณเซลลูโลสและอัตราการผลิตเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 17.0 g/L และ 1.70 g/L/d ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าความสูงของอาหารเหลวเป็นปัจจัยสำคัญต่อการผลิตวุ้นสวรรค์ (เมื่อความสูงของอาหารเหลวเพิ่มขึ้นอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนจากบรรยากาศสู่อาหารเหลวจะลดน้อยลง)

จากภาพที่ 2 (ก) เมื่อพิจารณาที่ความสูงของอาหารเหลวเท่ากับ 3.4 และ 4.2 เซนติเมตร พบว่าอัตราการผลิตเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้เวลาในการหมักนานขึ้นจนถึงวันที่ 10 หลังจากนั้นอัตราการผลิตเซลลูโลสจะลดลง ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะปรากฏของแผ่นวุ้นสวรรค์ในภาพที่ 3 ซึ่งพบว่าเมื่อหมักวุ้นสวรรค์โดยใช้ความสูงของอาหารเหลวเท่ากับ 4.2 เซนติเมตร นาน 7 วัน แผ่นวุ้นจะมีลักษณะเป็นช่องโหว่ตรงกลางซึ่งเกิดจากการผลิตเซลลูโลสที่ไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามพบว่าหากเพิ่มเวลาในการหมักเป็น 10 วัน แผ่นวุ้นที่ได้จะมีความสมบูรณ์มากที่สุด โดยมีลักษณะอัดตัวกันแน่น ทั้งนี้เพราะภายใต้สภาวะดังกล่าวยังคงมีสารอาหารและปริมาณออกซิเจนเพียงพอ

ต่อการเจริญและการผลิตเซลลูโลส ในขณะที่การหมักวุ้นสวรรค์นาน 14 วัน อัตราการผลิตเซลลูโลสจะลดลง ทั้งนี้เพราะว่าสารอาหารและออกซิเจนในอาหารมีปริมาณจำกัด นอกจากนี้อุณหภูมิและค่าพีเอชของอาหารก็เป็นปัจจัยสำคัญต่อการหมักวุ้นสวรรค์ด้วย โดยอุณหภูมิและค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 28 - 32 องศาเซลเซียส (สมศรี, 2531) และ 4 - 6 ตามลำดับ และพบว่าผลผลิตจะลดลงเมื่อค่าพีเอชต่ำกว่า 4 (Masaoka *et al*., 1993) โดยสภาวะที่เป็นกรดจะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้การเติมสารเคมีบางชนิดลงในอาหาร อาทิ แอลกอฮอล์ กลีเซอรอล กรดอินทรีย์ พอลิแซ็กคาไรด์ และสารที่ทำให้เกิดเจล (Gelling agent) สามารถเพิ่มผลผลิตวุ้นสวรรค์ได้ (Lin *et al*., 2013)

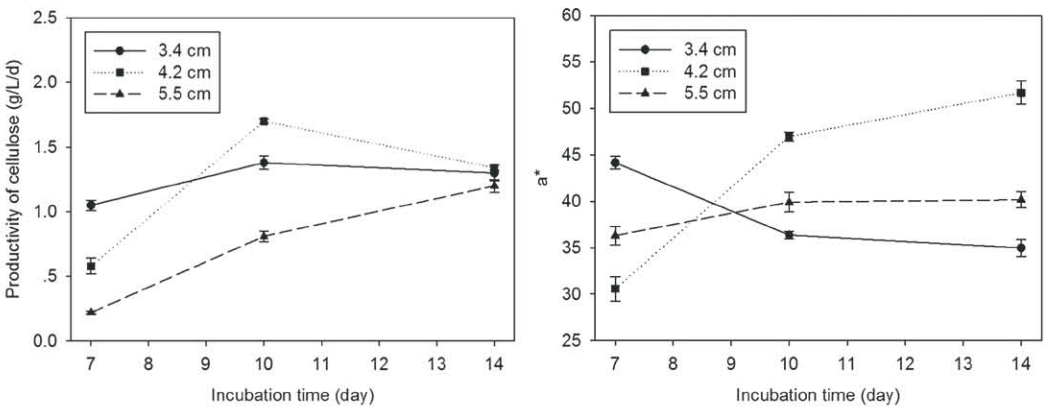
เมื่อพิจารณาค่า a* (ตารางที่ 5 และภาพที่ 2 (ข)) ของแผ่นวุ้นสวรรค์ที่ได้จากการหมักโดยใช้ความสูงของอาหารเหลวเท่ากับ 4.2 และ 5.5 เซนติเมตร พบว่าแผ่นวุ้นจะมีสีแดงเพิ่มมากขึ้น (ค่า a* เพิ่มขึ้น) ตามระยะเวลาการหมักที่นานขึ้น ในขณะที่การใช้ความสูงของอาหารเหลวเท่ากับ 3.4 เซนติเมตร ค่า a* ของแผ่นวุ้นมีแนวโน้มลดลง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าที่ระดับความสูงดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนออกซิเจนสูงสุด ส่งผลให้สารกลุ่มบีตาเลนในน้ำผลผักปลังสุกเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีขึ้น ดังนั้นการเพิ่มระยะเวลาในการหมักที่ระดับความสูงของอาหารเหลวดังกล่าว จึงเป็นการเพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสกันระหว่างสารกลุ่มบีตาเลนกับออกซิเจน

เนื่องจากวุ้นสวรรค์เป็น Gelatinous bacterial cellulose ประกอบด้วยเส้นใยละเอียดของเซลลูโลสซึ่งอยู่ในรูปของเจลที่เรียกว่า Cellulose microfiber จึงทำให้วุ้นที่ได้มีลักษณะเป็นเยื่อเหนียวและมีความแข็งเกิดขึ้น (เกรียงไกร และคณะ, 2558) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้วัดค่าแรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่าน (Penetration force) เพื่ออธิบายถึงความแข็งของแผ่นวุ้น จากตารางที่ 5 พบว่าระดับความสูงของอาหารเหลวและเวลาในการหมักไม่มีอิทธิพลต่อแรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่าน ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่าแผ่นวุ้นที่ได้จากชุดการทดลองที่ 4-9 (ใช้เวลาในการหมักนาน 10-14 วัน) ใช้แรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่านอยู่ในช่วง 3320.56 - 3778.74 N/m^2 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 1-3 (ใช้เวลาในการหมักนาน 7 วัน และให้ปริมาณเซลลูโลสต่ำกว่าชุดการทดลองข้างต้น) ใช้แรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่านต่ำกว่า (1796.70 - 2564.66 N/m^2) แสดงให้เห็นว่าการใช้เวลาในการหมักนานขึ้นแผ่นวุ้นจะมีความแข็งเพิ่มขึ้นด้วย จากผลการทดลองขั้นต้นได้คัดเลือกแผ่นวุ้นจากชุดการทดลองที่ 5 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากให้อัตราการผลิตเซลลูโลสสูงสุด อีกทั้งยังให้ปริมาณเซลลูโลสและค่า a* ของแผ่นวุ้นค่อนข้างสูงด้วย

ตารางที่ 5 ผลของระดับความสูงของอาหารเหลวและระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณเซลลูโลส อัตราการผลิตเซลลูโลส ค่า a* และแรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่านของแผ่นวุ้นสวรรค์

ชุดการทดลอง*	ปริมาณเซลลูโลส (g/L)	อัตราการผลิตเซลลูโลส (g/L/d)	ค่า a* (ค่าสีแดง)	แรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่าน (N/m^2)
1	7.35^{d}±0.04	1.05^{d}±0.04	44.15^{c}±0.67	$2{,}564.66^{ns}$±1.35
2	4.06^{f}±0.06	0.58^{f}±0.06	30.57^{g}±1.30	$1{,}817.77^{ns}$±0.73
3	1.54^{g}±0.01	0.22^{g}±0.01	36.30^{e}±0.98	$1{,}796.70^{ns}$±0.79
4	13.80^{b}±0.05	1.38^{b}±0.05	36.37^{e}±0.39	$3{,}320.56^{ns}$±0.54
5	17.00^{a}±0.02	1.70^{a}±0.02	46.97^{b}±0.46	$3{,}335.07^{ns}$±0.87
6	8.10^{e}±0.04	0.81^{e}±0.04	39.91^{d}±1.08	$3{,}366.64^{ns}$±0.42
7	18.20^{b}±0.06	1.30^{b}±0.06	34.98^{f}±0.91	$3{,}457.48^{ns}$±6.19
8	18.80^{b}±0.02	1.34^{b}±0.02	51.69^{a}±1.24	$3{,}643.76^{ns}$±0.70
9	16.80^{c}±0.05	1.20^{c}±0.05	40.16^{d}±0.87	$3{,}778.74^{ns}$±0.67

หมายเหตุ: * การกำหนดปัจจัยของแต่ละชุดการทดลองดูในตารางที่ 2, $^{a,b,c,d,e...}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), ^{ns} แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)



(ก) (ข)

ภาพที่ 2 ผลของระดับความสูงของอาหารเหลวและระยะเวลาในการหมักต่อ (ก) อัตราการผลิตเซลลูโลส และ (ข) ค่า a* ของแผ่นวุ้นสวรรค์

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 3 ลักษณะของแผ่นวุ้นสวรรค์ที่ผลิตได้จากการใช้ความสูงของอาหารเหลวเท่ากับ 4.2 เซนติเมตร และเวลาในการหมักเท่ากับ (ก) 7 วัน, (ข) 10 วัน และ (ค) 14 วัน

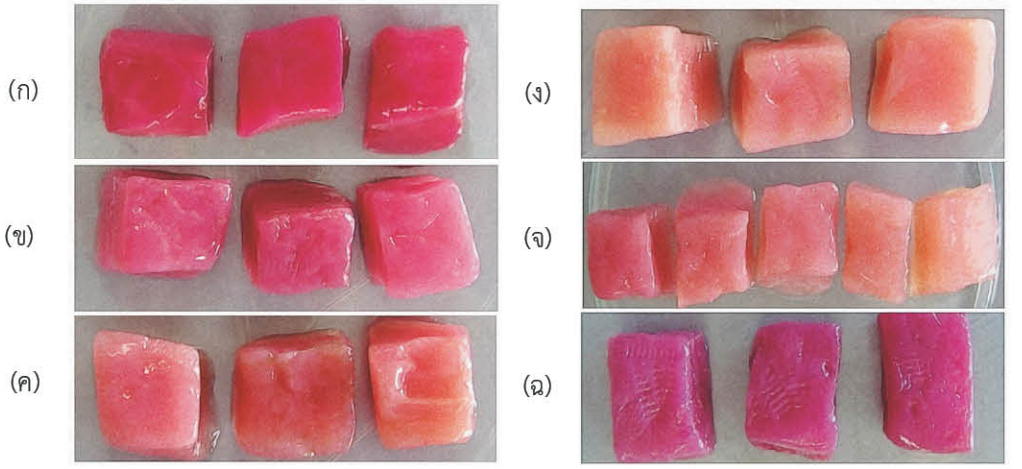
4. ผลของระยะเวลาในการต้มเดือดค่าพีเอช และการแช่เยือกแข็งต่อคุณภาพของวุ้นสวรรค์

การต้มเดือดส่งผลให้ค่า a* และค่าแรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่านลดลงตามระยะเวลาการต้มที่นานขึ้น โดยพบว่าการต้มเดือดนาน 15 นาที จะทำให้ค่า a* และค่าแรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่านลดลงมากที่สุดเท่ากับ 72.65 และ 28.31% ตามลำดับ (ตารางที่ 6) สอดคล้องกับลักษณะของชิ้นวุ้นในภาพที่ 4 (ก) – 4 (ง) ซึ่งพบว่าชิ้นวุ้นจะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงไปเป็นสีน้ำตาลตามระยะเวลาในการต้มที่นานขึ้น โดยทั่วไปแล้วสารกลุ่มบีตาเลนจะมีความไวต่อความร้อนค่อนข้างมาก โดยความร้อนจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของบีตาเลนผ่านทางปฏิกิริยาดีไกลโคซิเลชัน ไฮโดรไลซิส ดีคาร์บอกซิลเลชัน หรือไอโซเมอร์ไรเซชัน และทำให้เกิดสารต่าง ๆ เช่น Isobatanin, Betalamic acids และ Betalamic acids และพบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเป็นกรดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การต้มเดือดจะทำลายพันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมระหว่างสายไมโครไฟบริลของโครงสร้างเซลลูโลสเป็นผลให้ความแข็งแรงของเซลลูโลสลดลงตามระยะเวลาในการต้มเดือดหรือให้ความร้อน ด้วยเหตุนี้ชิ้นวุ้นที่ต้มเดือดเป็นเวลานานจึงใช้แรงในการเจาะทะลุผ่านน้อยกว่า ชิ้นวุ้นที่ต้มเดือดในระยะเวลาสั้นหรือไม่ผ่านการต้ม (Herbach *et al*., 2006; Stintzing & Carle, 2004) มีรายงานว่ากรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ความเข้มข้น 0.10% จะช่วยเพิ่มค่าครึ่งชีวิตของบีตาไซยานินเป็น 2 เท่า เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความร้อนสูง (Azeredo, 2009)

เมื่อพิจารณาผลของค่าพีเอชพบว่าสีม่วงแดงของชิ้นวุ้นมีเสถียรภาพมากที่สุดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 3 ในขณะที่พีเอชเท่ากับ 7 จะถูกทำลายมากที่สุด (87%) (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 4 (จ)) โดยทั่วไปแล้วบีตาเลนมีความคงตัวในช่วงพีเอช 4-7 (Von Elbe *et al.*, 1974; Herbach *et al.*, 2006) สภาวะที่เป็นกรดจะช่วยรักษาความเสถียรของบีตาเลนและช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส ในขณะที่สภาวะที่พีเอชต่ำมาก ๆ สารกลุ่มบีตาเลนบางชนิดจะเกิดปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชันกลายเป็นสารชนิดอื่นที่ยังคงให้สีม่วงแดง ในขณะที่สารบีตาไซยานินจะเปลี่ยนเป็นสารนีโอเบตานิน หรือเกิดการย่อยสลายด้วยกรด (Acid hydrolysis) กลายเป็นกรดบีตาลามิก ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้ให้สีเหลือง (Herbach *et al.*, 2006; Stintzing & Carle, 2004; Azeredo, 2009)

ตารางที่ 6 ผลของระยะเวลาในการต้มเดือด ค่าพีเอช และการแช่เยือกแข็งต่อค่า a* ของวุ้นสวรรค์และแรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่าน (Penetration force)

สภาวะ	ค่า a*			ค่าแรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่าน (N/m^2)		
	ก่อน	หลัง	การลดลง (%)	ก่อน	หลัง	การลดลง (%)
การต้มเดือด (นาที)						
5	46.13±0.31	28.64±0.55	37.91	1,824.96±0.39	1,743.0±0.73	4.49
10	33.30±0.28	13.50±0.50	59.45	1,542.16±0.29	1,425.24±0.92	7.58
15	42.16±0.41	11.53±0.97	72.65	1,706.20±0.93	1,223.14±0.18	28.31
ค่าพีเอช (48 ชั่วโมง)						
3	36.89±0.30	18.03±0.79	51.12	2,889.68±0.49	2,627.02±0.41	9.08
4	35.91±0.83	13.26±0.48	63.07	2,898.64±0.42	2,539.30±0.57	12.39
5	57.65±0.38	19.33±0.50	66.47	2,216.68±0.19	2,027.68±0.58	8.52
6	51.51±0.58	13.81±0.30	73.18	2,824.96±0.09	1,942.16±0.35	31.25
7	48.89±0.17	6.42±0.62	86.86	2,886.20±0.47	1,956.5±0.47	32.21
-20 องศาเซลเซียส (7 วัน)						
	34.42±1.21	30.43±0.51	11.59	1867.7±0.78	1800.7±0.88	3.58



ภาพที่ 4 ลักษณะปรากฏของวุ้นสวรรค์ (ก) ก่อนการทดสอบ, (ข) ต้มเดือดนาน 5 นาที, (ค) ต้มเดือดนาน 10 นาที, (ง) ต้มเดือดนาน 15 นาที, (จ) เมื่อแช่ในสารละลายที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 3, 4, 5, 6 และ 7 นาน 48 ชั่วโมง (จากซ้ายไปขวา) และ (ฉ) หลังจากแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

เมื่อพิจารณาค่าแรงสุดที่เจาะทะลุผ่านพบว่าการแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสภาพความเป็นกรดต่ำ (พีเอช 6-7) ชิ้นวุ้นจะมีความอ่อนนุ่มมากกว่าในสภาพที่มีความเป็นกรดสูงกว่า (พีเอช 3-5) โดยเห็นได้จาก % การลดลงของค่าแรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่านมีค่ามากกว่าอย่างเห็นได้ชัด (ตารางที่ 6) ในขณะที่การแช่เยือกแข็งส่งผลต่อค่า a* และค่าแรงสูงสุดในการเจาะทะลุผ่านเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 4 (ฉ))

ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับ Ng & Shyu (2004) ที่รายงานว่าสารสีแดงที่ติดอยู่บนชิ้นวุ้น Monascus- nata complex (เตรียมได้จากการนำชิ้นวุ้นสวรรค์ขนาดสี่เหลี่ยมลูกเต๋าไปหมักร่วมกับเชื้อรา *Monascus* sp.) ถูกทำลายได้มากที่สุดโดยการต้มเดือดนาน 15 นาที และการนึ่งด้วยความดันไอน้ำ (121°C 15 นาที) ในขณะที่การแช่เยือกแข็งส่งผลต่อการสลายตัวของสีแดงบนชิ้นวุ้นน้อยมาก

สรุป

การศึกษาการผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำผลผักปลังสุกพบว่า น้ำผลผักปลังสุกประกอบด้วยสารอาหาร แร่ธาตุ และวิตามินต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตวุ้นสวรรค์ของแบคทีเรีย *A. xylinum* โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตวุ้นสวรรค์ประกอบด้วยอัตราส่วนน้ำผลผักปลังสุกต่อน้ำมะพร้าวเท่ากับ 3:7 ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.5% (w/v)

และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 8 °brix การขยายขนาดการผลิตในระดับถาดพบว่าความสูงของอาหารเหลวและระยะเวลาในการหมักมีอิทธิพลต่อการผลิตวุ้นสวรรค์ การหมักที่ความสูงของอาหารเหลวเท่ากับ 4.2 เซนติเมตร นาน 10 วัน ให้อัตราการผลิตเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 1.70 g/L/d และพบว่าความเข้มของสีแดงและความแข็งของวุ้นสวรรค์ที่ผลิตได้ลดลงตามระยะเวลาการต้มเดือดที่นานขึ้น การศึกษาผลของค่าพีเอชพบว่าสีม่วงแดงของวุ้นสวรรค์มีเสถียรภาพมากที่สุดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 3 และถูกทำลายได้มากที่สุดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชเท่ากับ 7 ในขณะที่การแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 7 วัน ส่งผลต่อความคงตัวของสีแดงและความแข็งของวุ้นสวรรค์เพียงเล็กน้อย จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าผลผักปลังสุกมีศักยภาพในการผลิตวุ้นสวรรค์แต่จำเป็นต้องผสมกับน้ำมะพร้าวในอัตราส่วนที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น การศึกษาในโอกาสต่อไปควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตวุ้นสวรรค์ให้สูงขึ้น เช่น ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน ชนิดของสารเคมีหรือสารที่ทำให้เกิดเจล เป็นต้น นอกจากนี้ควรวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มบีตาเลนและคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของวุ้นสวรรค์ที่ผลิตได้ ตลอดจนศึกษาการเพิ่มความคงตัวของสีที่ติดอยู่บนวุ้นสวรรค์ และควรศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของวุ้นสวรรค์ที่ผลิตได้ เพื่อต่อยอดการประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ อาทิ อาหาร การแพทย์ ความงาม สิ่งแวดล้อม เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2551 มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

เอกสารอ้างอิง

เกรียงไกร พัทยากร อรัญญา พรหมกูล และวรรณทิชา เศวตบวร. (2558). คุณลักษณะของแบคทีเรียวุ้นสวรรค์ที่ผลิตได้จากแก้วมังกร. **แก่นเกษตร**, 43(1), 917-921.

คณะทำงานรวบรวมความรู้เกี่ยวกับผักในโครงการหนูรักผักสีเขียวโดยความร่วมมือระหว่างมูลนิธิโตโยต้าประเทศไทย และสถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. (2545). **มหัศจรรย์ ผัก 108**. (พิมพ์ครั้งที่ 8). กรุงเทพฯ: มูลนิธิโตโยต้าประเทศไทย.

ชื่นนภา ชัชวาล และ นาฏศจี นวลแก้ว (2552). ผักปลัง ผักที่มีคุณค่าทางโภชนาการ และมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ. **การแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก**, 7(2-3), 197-201.

ทัตดาว ภาษีผล เยาวมาลย์ รักษาเคน และ สุดารัตน์ นามโฮง. (2555). การสกัดบีตาเลนจากผลผักปลัง. **วิทยาศาสตร์เกษตร**, 43(3), 368-371.

ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี. (2536). ปัจจัยสำคัญในการผลิตวุ้นสวรรค์. **อาหารและอุตสาหกรรมเกษตร**, 6(6), 44-50.

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2545). **เคมีอาหาร**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

เยาวพา สุวัตถิ. (2548). **เส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรีย**. งานวิจัยอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยและพัฒนา กรุงเทพฯ.

วราวุฒิ ครูส่ง กรวิกา สุขศรีวงษ์ และ ปนัดดา พวงเกษม. (2536). การผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* ในน้ำหางนม. **วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง**, 1(1), 46-60.

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. (2545). **ผลิตภัณฑ์วุ้นมะพร้าว/วุ้นสับปะรด.** เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

สมคิด ธรรมรัตน์. (2531). การผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวและการแปรรูป. **อาหาร**, 18(4), 250-262.

สมศรี ลีปิพัฒนวิทย์. (2531). การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับทำวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าวแก่. **อาหาร**, 18(4), 239-249.

สัมพันธ์ กล้าเวช และ สมภพ วรสายัณห์. (2544). **การผลิตน้ำผักปลัง**. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร ปัญหาพิเศษปริญญาตรี คณะเกษตรศาสตร์ นครศรีธรรมราช สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.

อนันต์ บุญปาน สิริแข พงษ์สวัสดิ์ และ จิรพรรณ คำผา. (2553). **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตวุ้นสวรรค์จากกากน้ำตาล**. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 ประจำปี 2553 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร, 547-554.

Akhter, S., Abdul, H., Shawkat, I.S., Swapan, K. S. , Mohammad, S.H.C., & Sanjay, S.S. (2008). A review on the use of non-timber forest products in beauty- care in Bangladesh. **Journal of Forestry Research**, 19, 72-78.

Amnuaikit, T., Chusuit, T., Raknam, P., & Boonme, P. (2011). Effects of a cellulose mask synthesized by a bacterium

on facial skin characteristics and user satisfaction. **Medical Devices: Evidence and Research**, 4(1), 77-81.

AOAC. (2000). **Official method of analysis of the association of the analytical chemists**. USA: AOAC International, Rockville, MA.

Asai, T. (1968). **Acetic acid bacteria: Classification and bio chemical activities**. Tokyo: University of Tokyo Press.

Awadhiya, A., Kumar, D., Bushara, R., & Verma, V. (2016). Synthesis and characterization of agarose-bacterial cellulose biodegradable composites. **Polymer Bulletin**, 74(7), 2887-2903.

Azeredo, H. M. C. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability-a review. **International Journal of Food Science and Technology**, 44, 2365-2376.

Coeffy, D. G., & Bell, D. A. (1995). Cellulose and cellulose derivative. In Stephen, A.M. (Eds.). **Food Polysaccharide and their application**. New York: Dekker.

Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., & Brown, R. M. J. (2006). Microbial cellulose- the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, 27(2), 145-151.

Dudman, W. F. (1960). Cellulose production by *Acetobacter* strains in submerged culture. **Journal of General Microbiology**, 22, 25-39.

Glassgen, W.E, Metzger, J.W, Heuer, S., & Strack, D. (1993). Bata cyanins from fruits of *Basella rubra*. **Phytochemistry**, 33(6), 1525-1527.

Hasan, N., Biak, D. R. A., & Kamarudin, S. (2012). Application of bacterial cellulose (BC) in natural facial scrub. **International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology**, 2(4), 1-4.

Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation-structural and chromatic aspects. **Journal of food science**, 71(4), R41-R50.

Hwang, J.W., Yang, Y.K., Hwang, J.K., Pyun, Y.R., & Kim, Y.S. (1999). Effect of dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agigated culture. **Journal of Bioscience and Bio engineering**, 88(2), 183-188.

Jagannath, A., Kalaiselvan, A., Manjunatha, S.S., Raju, P.S., & Bawa, A.S. (2008). The effect of pH, sucrose and ammonium sulphate concentrations on the production of bacterial cellulose (Nata-de-coco) by *Acetobacter xylinum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24, 2593-2599.

Jonas, R., & Farahh, L.F. (1998). Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, 59(1-3), 101-106.

Klemm, D., Schumann, D., Udhardta, U., & Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose- artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, 26, 1561-1603.

Klemm, D., Schumann, D., Kramer, F., Heßler, N., Hornung, M., Schmauder, H.P., & Marsch, S. (2006). Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. **Advances in Polymer Science**, 205(1), 49-96.

Lapuz, M.M., Gallardo, E.G., & Palo, M. A. (1967). The nata organism cultural require ments, characteristics and identity. **Philippine Journal of Science**, 96(2), 91-108.

Levinson, D.J., & Glonek, T. (2010). **Microbial cellulose contact lens**. US patents, US 7832857 B2.

Lin, S.P., Calvar, I.L., Catchmark, J.M., Liu, J.R., Demirci, A., & Cheng, K. C. (2013). Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. **Cellulose**, 20(5), 2191-2219.

Masaoka, S., Ohe, T., & Sakota, N. (1993). Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. **Journal**

of Fermentation and Bioengineering, 75(1), 18-22.

Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2004). Development and production of cholesterol- lowering Monascus- nata complex. **World Journal of Micro biology & Biotechnology**, 20(9), 875-879.

Ross, P., Raphae, M., & Moshe, B. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological reviews**, 55(1), 35-58.

Saikia, A.P., Ryakala, V.K., Shama, P., Goswami, P., & Bora, U. (2006). Ethnobotany of medicinal plants used by Assamese people for various skin aliments and cosmetics. **Journal of Ethnopharma cology**, 106(2), 149-157.

Schramn, M., & Hestrin, S. (1954). Factors affecting production of cellulose at the air/ liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. **Journal of General microbiology**, 11, 123-129.

Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G.O., & Yang, G. (2014). Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, 35, 539-545.

Stintzing, F.C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, 15(1), 19-38.

Valla, S. (1995). **Food Biotechnology Microorganism for cellulose production.** New York: VCH Publisher Inc.

Velásquez-RiañoEmail, M., & Bojacá, V. (2017). Production of bacterial cellulose from alternative low- cost substrates. **Cellulose**, 24(7), 2677-2698.

Von Elbe, J. H., Maing, I. - Y., & Amundson, C.H. (1974). Color stability of betanin. **Journal of Food Science**, 39(2), 334-337.

Watanabe, K. & Yamanaka, S. (1995). Effect of oxygen tension in the gaseous phase on production and physiological properties of bacterial cellulose formed under static culture

conditions. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 59, 65-68.

Xiao, L., Mai, Y., He, F., Yu, L., Zhang, L., Tang, H., & Yang, G. (2012). Bio- based Green composites with high performance from poly (lactic acid) and surface modified microcrystalline cellulose. **Journal of Materials Chemistry**, 22(31), 15732-15739.

Yang, G., Xie, J., Hong, F., Cao, Z., & Yang, X. (2012). Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: Effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose. **Carbohydrate polymers**, 87(1), 839-845.