บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 วุ้นน้ำมะพร้าว

วุ้นน้ำมะพร้าวได้จากการหมักน้ำมะพร้าวด้วย *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ (bacterial cellulose) จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่ามีรูปร่างกลมรีหรือท่อน ขนาดความยาว 2 ไมครอน กว้าง 0.6 ไมครอน เมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้นจะวัดได้ประมาณ 4-9 ไมครอน โคโลนีมีลักษณะกลมนูนทึบแสง ขอบโคโลนีเคลื่ยงไม่มีรอยหยักติดทั้งแกรมลบและบวกขึ้นกับอายุของเซลล์ ขยายพันธุ์แบบไบนารีฟิวชั่น หลังจากนั้นจะสร้างสารมีลักษณะเป็นเยื่อเหนียวสีน้ำตาลอ่อนเป็นเมือกรอบโคโลนี ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปล่อยออกมา ไม่สร้างเอนโดสปอร์ เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศ (obligate aerobic) ในการเจริญ สามารถสร้างเอนไซม์แคแทเลส (catalase) สามารถเจริญในอาหารที่มีเอทานอลเป็นส่วนประกอบไม่เกินร้อยละ 6 เชื้อจะไม่สร้างสี ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเทรต หรือย่อยเจลาทิน ไม่สร้างอินโดล (indole) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไม่สามารถย่อยแป้ง (Alaban, 1962; Lapus, Gallado, and Palo, 1967) เมื่อนำมาหมักกับน้ำตาลหรือน้ำผลไม้จะสร้างสารเมือกมีลักษณะเป็นเจลใสที่ผิวหน้า แล้วค่อยๆเปลี่ยนเป็นเยื่อคล้ายวุ้น (gellatineous membrane) สีขาวขุ่นรวมตัวเป็นเส้นใยขนาดใหญ่และหนาขึ้น เรียก " Nata หรือ วุ้นมะพร้าว " ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าวุ้นมะพร้าวเป็นเส้นใยเซลลูโลส ซึ่งประกอบด้วยไมเลกุลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 glycosidic (Dimaguila, 1967) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น ย่อยด้วยกรด หรือ เอนไซม์ การละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกัน และการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟี, เครื่อง infrared spectroscopy, ultraviolet spectroscopy, nuclear magnetic resonance, X-ray diffraction และ electrophoresis พบว่าเซลลูโลสของวุ้นน้ำมะพร้าวมีลักษณะคล้ายเซลลูโลสจากพืช (Kaushal and Walker, 1951 ; Hestrin and Schramm, 1954) เมื่อนำวุ้นน้ำมะพร้าวมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่า มีคาร์โบไฮเดรต และ เส้นใย มากถึงร้อยละ 53.57-59.26 และ ร้อยละ 19.64-21.3 ตามลำดับ (โดยน้ำหนักแห้ง)

2.2 การผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp.

แหล่งเซลลูโลสที่ใช้กันส่วนใหญ่ได้จากพืช นอกจากนี้ได้จาก อะมีบา ราเมือก สาหร่าย ทะเล และ แบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas, Achomobacter, Aerobacter, Rhizobium, Agrobacter, Azotobacter* และ *Acetobacter* (Legge, 1990) โดยเฉพาะ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* แต่สาเหตุที่ *A. xylinum* ได้รับความสนใจมากกว่าแบคทีเรียอื่น เนื่องจาก เส้นใยเซลลูโลสมีขนาดเล็กมาก ดังนั้นจึงสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารเคมีได้ดี (Tabuchi et al., 1998) เส้นใยที่สร้างไม่มี เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเพกทินเจือปน เส้นใยมีความเป็น hydrophilic สูง เนื่องจากการมีพื้นที่ผิวในโครงสร้างมากจึงอุ้มน้ำได้สูงถึง 60-700 เท่าของน้ำหนักแห้ง เส้นใยทนต่อแรงดึงได้สูงกว่าไฟเบอร์สังเคราะห์ต่างๆ ในการสังเคราะห์เซลลูโลสสามารถใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก หาง่ายในท้องถิ่น เช่น น้ำมะพร้าว ในการสร้างเซลลูโลส *A. xylinum* และในช่วงที่ไฟบริลเกาะเป็นสายจนเป็น amorphous cellulose สามารถควบคุมให้มีสมบัติทางกายภาพตามต้องการ โดยการจัดการเกี่ยวกับความหนาแน่นของเซลล์ องค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงและภาวะการหมักการผลิตเซลลูโลส (White and Brown, 1989) โดย *A. xylinum* สามารถหมักในสภาพอาหารเหลวซึ่งทำได้ 2 ภาวะ ดังนี้

2.2.1. การหมักในภาวะนิ่ง (static culture)

เมื่อเชื้อเจริญและมีปริมาณมากถึงระดับหนึ่งจะสร้างใยใสซึ่งอาหารเหลวจะขุ่นหลังจากนั้นเส้นใยจะสานกันเป็นแผ่น (pellicle) ที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วอาหารเหลวจะเริ่มใส เนื่องจาก pellicle จะทำหน้าที่พาเซลล์แบคทีเรียขึ้นสู่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นบริเวณที่ออกซิเจนมีความเข้มข้นสูง โดยอาศัยฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิสม (Schramm and Hestrin, 1954) เมื่อแยกแผ่นวุ้นออกมาจากอาหารเหลวแล้วนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า มีเซลล์ของเชื้อ *Acetobacter* sp. แทรกอยู่ในสายเซลลูโลส (Dimaguila, 1967) ดังนั้นแบคทีเรียเจริญได้โดยใช้อาหารซึ่งแพร่ผ่าน(diffuse) จากอาหารเหลวด้านล่างสู่ด้านบนของแผ่นวุ้น (Borzani and Souza, 1995) โดยความหนาจะขึ้นกับ ส่วนประกอบของอาหาร และพื้นที่ผิวของอาหารที่สัมผัสกับอากาศแผ่นวุ้นที่สร้างขึ้นอาจจะจมลงได้เมื่อมีการกระทบกระเทือน ซึ่งเมื่อแผ่นวุ้นจมลงเชื้อจะสร้างแผ่นวุ้นขึ้นมาใหม่แต่จะบางกว่าแผ่นเดิม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.2 การหมักที่มีการให้อากาศแก่น้ำหมัก

2.2.2.1 การหมักที่มีการให้อากาศแก่น้ำหมักโดยการเขย่าในขวดรูปชมพู่

แบคทีเรียจะเจริญได้เร็วโดยแบ่งตัวเป็น 2 เท่า (doubling time) ทุก 4-6 ชั่วโมงในภาวะเขย่า ขณะที่หากหมักในภาวะนิ่งจะแบ่งตัวทุก 8-10 ชั่วโมง แต่ความสามารถในการสร้างเซลลูโลสลดลง โดยลักษณะของเซลลูโลสจะรวมตัวกันเป็นก้อนกลม (pellet) ขนาดประมาณ 10 มิลลิเมตร (Cannon and Anderson, 1991) Dudman(1960) รายงายว่าการหมักในภาวะเขย่าในขวดรูปชมพู่ที่ผนังมี baffle จะให้เซลลูโลสสูงกว่าขวดรูปชมพู่ที่มีผนังเรียบ (smooth-walled flasks) แต่เซลลูโลสเกาะที่ผนังขวดบริเวณที่อาหารสัมผัสกับอากาศด้านบน ซึ่งขณะเขย่าจะทำให้เกิดการกระจายและฟองเป็นจำนวนมาก ดังนั้น Toyasaki และคณะ (1995)จึงได้ปรับปรุงรูปร่าง baffle ให้มีลักษณะลาดเอียงตามทิศทางการกวน (slant-baffled flasks) พบว่าเซลล์เข้าสู่การเจริญแบบทวีคูณ (log phase) ระยะ 2 วันแรก และสร้างเซลลูโลสได้มากกว่าขวดรูปชมพู่ที่มี baffle เดิมถึง 2 เท่า เนื่องจากเกิดการกระจายที่พอเหมาะซึ่งป้องกันการเกิดแรงเฉือน นอกจากนั้นในขณะเขย่ายังพบสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการสร้างเซลลูโลสได้น้อยลง (cellulose less mutant) (Valla and Kjosbakken, 1982)

2.2.2.2 ให้อากาศแก่น้ำหมักในถังหมัก

เนื่องจากการหมักในภาวะนิ่งมีข้อจำกัด คือ ใช้เวลาหมักนาน ใช้แรงงานและพื้นที่ในการหมักมาก แต่ความต้องการใช้เซลลูโลสในอุตสาหกรรมมีมากขึ้นจึงมีการพัฒนาหมักในถังหมัก(jar fermenter) ถึงแม้รายงานที่ผ่านมาพบว่าการหมักในภาวะนิ่งจะให้ผลผลิตที่ดีกว่า แต่การเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียและองค์ประกอบของอาหารก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อปริมาณเซลลูโลส Tsuchida และ Yoshinaga (1997) แยก *Acetobacter* sp.BPR2001 จากธรรมชาติพบว่าเหมาะกับการเลี้ยงในถังหมักและให้ผลผลิตสูง Guzman, Alabastro และ Tinsay (1987) ได้หมักเซลลูโลสในถังหมัก มีอัตราการให้อากาศ 1.25 ลิตร/นาที , ความเร็วรอบในการกวน 800 รอบต่อนาที , ปริมาตรของอาหารหมัก 1 ลิตร และ อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เทียบกับการหมักในภาวะนิ่งในอาหารชนิดเดียวกัน พบว่าผลผลิตเซลลูโลสในถังหมักสูงกว่าถึงร้อยละ49.05 แต่ข้อเสียของการเลี้ยงในถังหมักคือ จากการที่อาหารหมักนี้มีคุณสมบัติเป็น Non-newtonian ทำให้ระหว่างการหมักอาหารจะมีความหนืดสูงขึ้นยากต่อการกวน, การควบคุมความเป็นกรดด่างและการละลายของออกซิเจนในอาหารหมัก (Kouda et al., 1996) Kouda, Yano และ Fumihiro (1997) ได้ปรับปรุงใบกวนในถังหมัก (impeller) พบว่า mexblend และ gate with turbine impeller ทำให้มี

การผสมและประสิทธิภาพการถ่ายเทออกซิเจน (K_La) ได้ดีกว่าใบกวนชนิดอื่นซึ่งผลต่อการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรีย จึงเสนอว่า อัตราและผลผลิตการสร้างเซลลูโลสขึ้นกับประสิทธิภาพการถ่ายเทออกซิเจนและ การส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่กระบวนการหมัก (OTR; oxygen transfer rate)

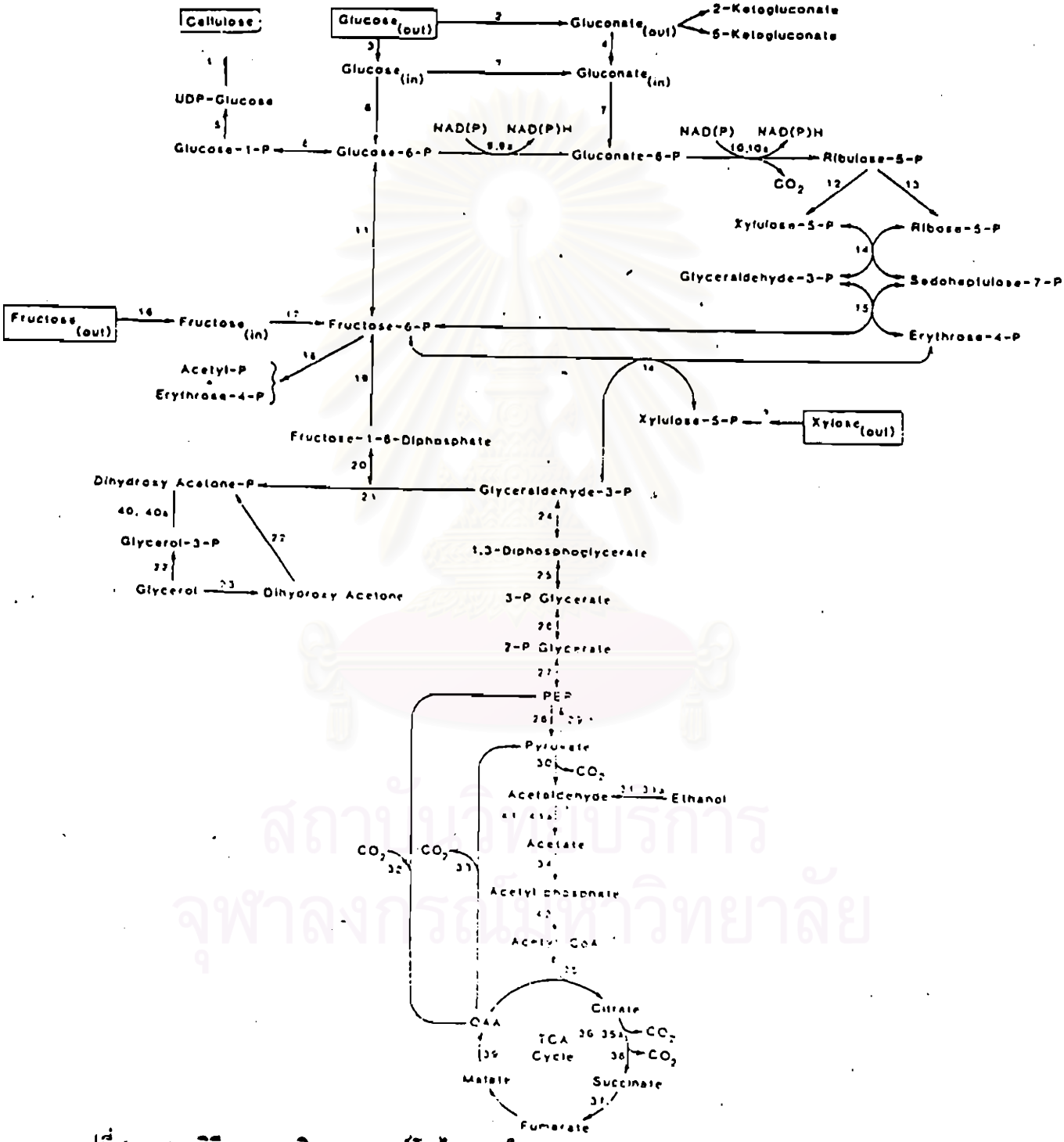
2.3 <u>ชีวเคมีของการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter* sp.</u>

ในการสังเคราะห์เซลลูโลสจาก *Acetobacter* sp. นอกจากใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น (substrate)แล้วยังสามารถใช้สารตั้งต้นอื่นๆ เช่น เฮกโซส เฮกโซเนท สารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอม เช่น pyruvate, glycerol และ dihydroxyacetone และ สารประกอบที่มีคาร์บอน 4 อะตอม เช่น dicarboxylic acid สารเหล่านี้มักต้องถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่สามารถป้อนเข้าสู่ตอนใดตอนหนึ่งของวิถีไกลโคลิซีส ซึ่งทำให้กระบวนการเมแทบอลิสมของ *A. xylinum* เกิดขึ้นได้หลายกระบวนการ (Ross, Mayer, and Benziman, 1991) ดังนี้ (รูปที่ 1)

1. เกิดขึ้นโดยตรง จากกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่น้ำตาลเฮกโซสที่นำเข้ามาจากภายนอกเซลล์ให้เป็นอนุพันธุ์ฟอสเฟต (phosphate derivatives) ก่อน แล้วจึงเปลี่ยนแปลงต่อไปให้เป็นสารตัวกลางในวิถีไกลโคลิซีส

2. เกิดขึ้นทางอ้อม โดยผ่านวิถีไตรคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) สำหรับการออกซิเดชันกรดอินทรีย์และอนุพันธ์ Gluconeogenesis ซึ่งเป็นการสร้างกลูโคสจากสารตั้งต้นที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตเช่น ไพรูเวท ซึ่งเป็นสารตัวกลางในวิถีไกลโคลิซิส โดยใน *A. xylinum* เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ oxaloacetrate (OAA) ไปเป็น pyruvate ทั้งนี้เนื่องมาจากการควบคุมของเอนไซม์ oxaloacetrate decarboxylase (33) และ pyruvate phosphate dikinase(29) ที่ผิดปกติและ วิถีเพนโทสสำหรับการสลายกลูโคส แต่อย่างไรก็ตาม glucose-6-phosphate (G6P) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในวิถีจะเปลี่ยนไปเป็นเซลลูโลสหรือเข้าสู่วิถีเพนโทสจะขึ้นกับ ATP หากมีมากจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บริเวณจุดเปลี่ยน คือ 9 หรือ 9a ตัวใดตัวหนึ่ง ดังนั้นการสังเคราะห์เซลลูโลสจาก *A. xylinum* เริ่มจาก กลูโคสถูกเปลี่ยนเป็น G6P จากปฏิกิริยา phosphorylation โดยเอนไซม์ glucokinase แล้ว G6P จะถูกเปลี่ยนเป็น G1P โดยเอนไซม์ phosphoglucomutase จากนั้น G1P จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น UDPG โดยเอนไซม์ UDPG- pyrophosphorylase แล้ว UDPG จะต่อกันเป็นสายเซลลูโลสโดยการทำงานของเอนไซม์ cellulose synthase ซึ่งกลไกการทำงานมีดังนี้ ปกติเอนไซม์ cellulose synthase จะอยู่ในรูป non-activated cellulose synthase ซึ่งจะไม่สร้างเซลลูโลส แต่เอนไซม์ cellulose synthase จะถูกกระตุ้นให้ทำงานโดย C-di-GMP สร้างจาก GTP 2 โมเลกุลไปเป็น 5' triphosphate dimer (pppGpG) ซึ่งมี Mg^{2+} เป็น cofactor จากนั้นเปลี่ยนไปในรูป

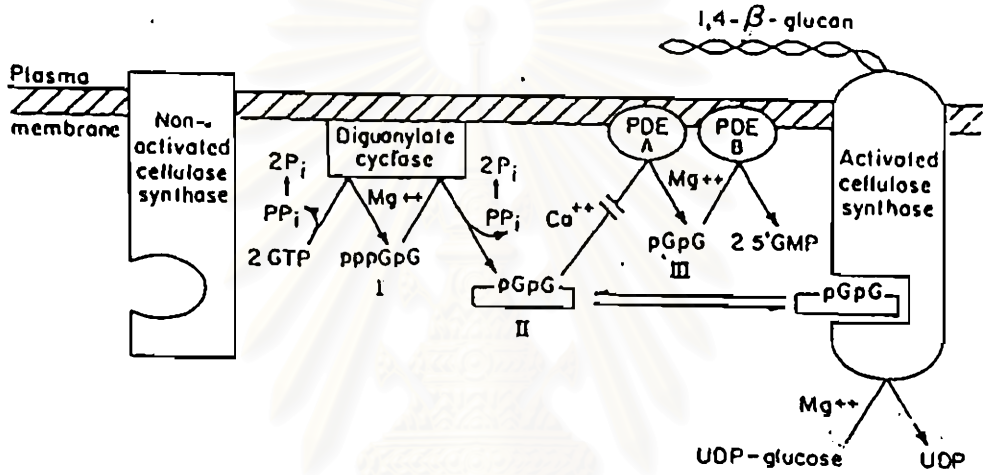
cyclic diguanylic acid หรือ C-di-GMP (--pGpG --) แต่ละขั้นจะสูญเสียฟอสเฟต แล้ว C-di-GMP เข้าจับบริเวณ active site ของ cellulose synthase กระตุ้นให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้ (activated cellulose synthase) ซึ่งจะสร้างเซลลูโลส



รูปที่ 1 แสดงวิถีเมตาบอลิสมของคาร์โบไฮเดรตใน *A. xylinum*

ที่มา: Ross, Mayer, and Benziman (1991)

โดยการนำ UDPG ที่สังเคราะห์ได้มาต่อกันเป็นสายเซลลูโลส อย่างไรก็ตามพบว่า C-di-GMP จะกระตุ้นการทำงานของ cellulose synthase ได้ก็ต่อเมื่อภายในระบบมี Ca^{2+} ในปริมาณเพียงพอที่จะยับยั้งการทำงานของ PDE A หรือ calcium-sensitive phosphodiesterase โดย PDE A จะไปตัดโครงสร้างในส่วนที่เป็นวงแหวนได้เป็น pGpG จากนั้น PDE B ทำหน้าที่เปลี่ยน pGpG ไปอยู่ในรูป 5'GMP 2 โมเลกุล ซึ่งไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ cellulose synthase ได้ (รูปที่ 2)

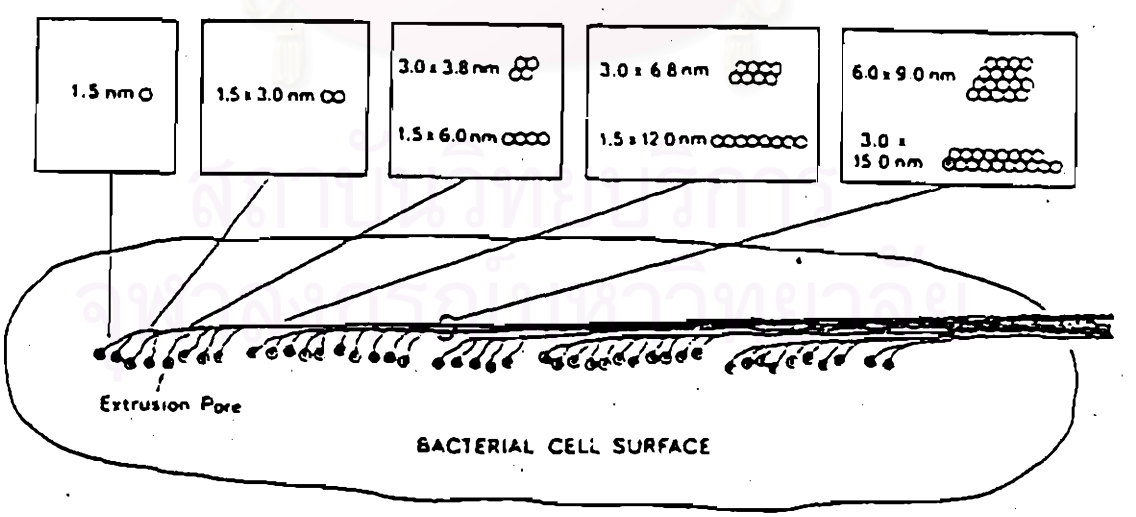


รูปที่ 2 ภาพจำลองกลไกการทำงานของ cellulose synthase บน plasma membrane ของ *A. xylinum*

ที่มา: Brown, Haigler, Suttie, White, Robert, Smith, Itoh, and Cooper (1983)

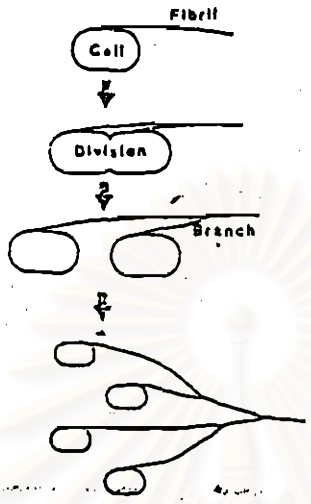
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการสังเคราะห์ เซลลูโลสจะถูกขับออกมานอกเซลล์เมื่อดูด้วย Transmission electron microscopy และ freeze-etching พบว่าการสังเคราะห์เซลลูโลสจะเกิดบริเวณ cytoplasmic membrane (Cannon and Anderson, 1991) เซลลูโลสจะถูกขับออกมาทางรูตามแกนซึ่งเรียงขนานกับความยาวของเซลล์ (รูปที่ 3) โดยแต่ละสายเซลลูโลสจะประกอบด้วยเส้นใยขนาดเล็ก เรียก submicrofibril มีขนาดกว้าง 1.5 นาโนเมตร จากนั้นแต่ละ submicrofibril จะรวมตัวกันมีลักษณะเป็นเกลียวเวียนซ้ายแล้วรวมตัวกันเป็นสายไมโครไฟบริลเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 - 4 นาโนเมตร ซึ่งขนาดของไมโครไฟบริลจะขึ้นกับขนาด crystallite ของ ไมโครไฟบริล (Neiduszynski and Preston, 1970) แล้วแต่ละสายของไมโครไฟบริลจะมัดรวมตัวกันเป็น ribbon มีความกว้างประมาณ 40-60 นาโนเมตร หนา 3-8 นาโนเมตร ลักษณะการจัดเรียงตัวกันของ ribbon จะเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ (Legge, 1990) Yoshinaga,Tonouchi และ Watanabe(1997)ได้เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลลูโลสที่สร้างจากแบคทีเรียกับเซลลูโลสชนิดอื่นพบว่าเซลลูโลสที่สังเคราะห์โดยแบคทีเรียมีขนาดเล็กกว่าเซลลูโลสชนิดอื่นประมาณ 100-1000 เท่า นอกจากนี้เส้นใยเซลลูโลสที่แยกได้จากแบคทีเรียยังมีการแตกกิ่งก้านแบบ 3-way branching point ตลอดความยาว การแตกกิ่งของไมโครไฟบริลเกิดจากการแบ่งเซลล์ในการเจริญของแบคทีเรีย ดังรูปที่ 4 ความยาวของไฟบริลระหว่างจุดแตกกิ่งก้านมีความยาวประมาณ 180-960 นาโนเมตร (Brown, Wilison, and Richardson, 1976)



รูปที่ 3 การรวมตัวกันของสายเซลลูโลสที่สังเคราะห์จาก *A. xylinum*

ที่มา: Ross, Mayer, and Benziman (1991)



รูปที่ 4 กลไกการแตกกิ่งก้านของไฟบริลเซลลูโลสจาก *A. xylinum*
ที่มา: Yamanaka (1989)

2.4 <u>ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการสร้างเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp.</u>

การผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp. จะให้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการคือ สายพันธุ์ของ *Acetobacter* sp.และภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ซึ่งแตกต่างไปตามสายพันธุ์และวิธีการที่ใช้ ดังนั้นจะต้องมีการศึกษาปัจจัยทั้ง 2 ประการนี้ควบคู่กันไป

2.4.1. สายพันธุ์ของ *Acetobacter* sp.

แบคทีเรียที่สร้างวุ้นน้ำมะพร้าว เป็นแบคทีเรียจำพวกเดียวกับแบคทีเรียที่สร้างกรดน้ำส้ม พบอยู่ในธรรมชาติส่วนใหญ่พบจากผลไม้ เมื่ออ้างถึง Bergey 's Manual of Determinative Bacteriology ที่จัดพิมพ์ครั้งที่ 8 มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* หรือ *A. xylinum* การเลือกสายพันธุ์เพื่อนำมาผลิตเซลลูโลสมีหลักเกณฑ์การดังนี้ คือ เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิตเซลลูโลสสูงในระยะเวลาสั้นจีนส์ที่ควบคุมการผลิตเซลลูโลสมีความเสถียร ให้ผลผลิตสม่ำเสมอ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดและราคาถูก ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมได้ดี และให้กรดอื่นที่ไม่ต้องการในปริมาณต่ำ

2.4.2 ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น

การผลิตวุ้นที่มีคุณภาพดีควรใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้คัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมปริมาณเชื้อที่ใช้ต้องมีปริมาณมากพอ เพื่อให้เชื้อสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว จนได้ปริมาณมากเกินกว่าเชื้ออื่นที่ติดมา หรือเชื้อที่อาจปนเปื้อนระหว่างการหมัก ทั้งนี้พบว่า ปริมาณเชื้อที่เหมาะสม คือ อยู่ในช่วงร้อยละ 10-20 จะทำให้ผลผลิตดีที่สุด แต่ถ้าใช้เชื้อเริ่มต้นมากขึ้นผลผลิตกลับลดลง (สมคิด ธรรมรัตน์, 2531)

2.4.3 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ*Acetobacter* sp. โดยเป็นแหล่งพลังงานแก่เชื้อและองค์ประกอบหลักของสายเซลลูโลส โดยเชื้อสามารถใช้คาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ได้หลายแหล่ง ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น ฟรุคโทส กาแลกโทส กลูโคส แมนโนส ไซโลส และ อาราบิโนส, น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น แลกโทส มอลโทส และซูโครส, น้ำตาลเชิงซ้อน เช่น แป้ง, แอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล เอทีลีนไกลคอล ไดเอทีลีนไกลคอล โพรพิลีนไกลคอล ไกลคอล อิโนซิทอล, กรดอินทรีย์เช่น กรดซิทริก กรดมาลิก กรดซัคซินิก กรดกลูโคนิก และอื่นๆ เช่น กลูโคโนแลกโทน (Masaoka, Ohe, and Sakota, 1993)

Kojima และคณะ (1998) พบว่า *Acetobacter xylinum* subsp. *nonacetoxidan* subsp. *nov* BPR 2001 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่เจริญและสร้างเซลลูโลสในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส จากการศึกษาพบว่า ต่างจาก *Acetobacter* sp. อื่น คือไม่สามารถออกซิไดซ์อะซิเตท และแลกเทตให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำได้

นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้วความเข้มข้นก็มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสเช่นกัน Masaoka และคณะ (1993) ทดลองแปรชนิดของแหล่งคาร์บอน พบว่า กลูโคส ฟรุกโทส และกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม และพบว่า เซลลูโลสจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นพร้อมกับการสะสมของกรดกลูโคนิกในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูง Oikawa, Ohtori, และ Ameyama (1995) เลี้ยง *A. xylinum* KU-1 ในอาหารที่มีแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นช่วงที่มีความเหมาะสมคือให้เซลลูโลสมากกว่าใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 3 เท่า ส่วน Oikawa, Morino และ Ameyama (1995) เลี้ยง *A. xylinum* KU-1 ในอาหารที่มีอาราบิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 เป็นช่วงที่มีความเหมาะสมคือให้เซลลูโลสมากกว่าใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 6 เท่า

นอกจากจะใช้แหล่งคาร์บอนดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนอื่น ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำกะทิ น้ำหางนม น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อน น้ำลิ้นจี่ น้ำฝรั่งสด น้ำมะเขือเทศ น้ำสับปะรดและ น้ำตาลปี๊บ (กรวิกา สุขศรีวงษ์, 2535) โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ควรหาได้สม่ำเสมอ และราคาถูก เพื่อให้สามารถขยายไปสู่ระดับอุตสาหกรรมได้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวมากที่สุด เนื่องจากน้ำมะพร้าวเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การทำมะพร้าวตากแห้ง การผลิตกะทิสำเร็จรูป และการผลิตน้ำมะพร้าวเป็นต้น ดังนั้นการใช้น้ำมะพร้าวมาเป็นวัตถุดิบยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุเหลือทิ้ง โดยน้ำมะพร้าวที่ใช้ควรเป็นน้ำมะพร้าวแก่ที่สด ใหม่ มีไขมันน้อย และไม่มีการปนเปื้อนของน้ำมะพร้า ซึ่งควรเติมน้ำตาลปริมาณที่มากพอสำหรับการเจริญและการสร้างวุ้น เพราะน้ำตาลที่มีในน้ำมะพร้าวปริมาณไม่แน่นอนขึ้นกับสายพันธุ์และความอ่อนแก่ของมะพร้าว โดยน้ำตาลที่มักเติมในการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว คือน้ำตาลซูโครส

2.4.4 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (pH)

ค่าความกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องมีการควบคุมก่อนการหมัก เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างเซลลูโลส การปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ *Acetobacter* sp. ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์โพรโทพลาสมขึ้นมาใหม่จนกระทั่งแบ่งตัวออกเป็นเซลล์ใหม่ (Dimaguila, 1967) อีกทั้งเชื้อยังนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนด้วย (Sanchez, 1978)

Toda และคณะ (1997) ทดลองใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดด้วยกรดแอซีติก พบว่า สามารถเพิ่มเซลลูโลส 3-4 เท่า และค่าความเป็นกรดในวันสุดท้ายของการหมักมีการเปลี่ยนแปลงจากวันแรกน้อย เมื่อเทียบกับการใช้ กรดซักซินิก กรดแลกทิก กรดกลูโคนิก และกรดไพรูวิก เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรด

Masaoka และคณะ (1993) ทดลองปรับค่าความเป็นกรดเริ่มต้นระหว่าง 2.5-7.7 พบว่า ค่าความเป็นกรดที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4-6 นอกจากนั้น พบว่าขณะหมักเกิดกรดกลูโคนิกเป็นผลให้ค่าความเป็นกรดต่ำลง แต่เมื่อใส่กรดกลูโคนิกในอาหารหมักจะไม่มีอิทธิพลต่อการสร้างเซลลูโลส

Oikawa และ คณะ (1995) ทดลองปรับ pH เริ่มต้นระหว่าง 3-8 พบว่า ค่าความเป็นกรดที่เหมาะสมเท่ากับ 5 เมื่อใช้อาราบิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ปรากฏว่าให้เซลลูโลสมากกว่าที่ใช้กลูโคสถึง 6 เท่า เนื่องจาก ตรวจไม่พบกรดกลูโคนิกในอาหารหมัก ซึ่งมีผลให้ค่าความเป็นกรดของอาหารหมักลดลงเพียงเล็กน้อย

นอกจากนั้นยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อราที่ทนต่อความเป็นกรดได้มากกว่า จากการรายงานของ Alaban (1962) พบว่า pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4-6 จะเหมาะกับการเจริญและการผลิตเซลลูโลส ส่วนที่ pH 3 การเจริญจะน้อยลง แต่ที่ pH 8 เชื้อไม่สามารถเจริญได้ พบว่ากรดแอซีติกร้อยละ 1 ช่วยป้องกันการปนเปื้อนจาก *Aspergillus* sp. ได้ และเมื่อเพิ่มปริมาณเป็นร้อยละ 2 จะช่วยป้องกันจากเชื้อ *Pennicillium* sp. และ *Basillus* sp. ได้

Toda และคณะ (1997) แยกแบคทีเรียที่ได้จากการปนเปื้อนกรดแอซีติก พบว่า *A. xylinum* DA สามารถสร้างเซลลูโลสได้ เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับกรดแอซีติกร้อยละ 2 สามารถเพิ่มเซลลูโลส 3-4 เท่า แต่เนื้อสัมผัสที่ได้จะนิ่ม และ pH สุดท้ายลดลงถึง 3.5 จึงทดลองใช้ แอซีเทตบัฟเฟอร์แทน ปรากฏว่า pH สุดท้ายลดลงเพียงเล็กน้อย สรุปสาเหตุที่ทำให้ pH ต่ำลง เนื่องจากแบคทีเรียสลายกลูโคสซึ่งเป็นสารประกอบที่ให้พลังงานสูงไปเป็นกรดกลูโคนิก แต่ถ้าใช้ซูโครสร่วมกับกรดแอซีติกทำให้เซลลูโลสลดลง ถึงแม้ว่าจะให้เซลลูโลสสูงในอาหารที่มีกลูโคสและฟรุกโทสก็ตามสันนิษฐานว่ากรดแอซีติกไปชะลอกิจกรรมของเอนไซม์ซูเครส หรือยับยั้งระบบการถ่ายทอดซูโครส

2.4.5 แหล่งไนโตรเจน

สารอาหารไนโตรเจนสำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่ถ้าปริมาณของไนโตรเจนในอาหารมากเกินไปจะไปลดประสิทธิภาพการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (Whistler and Bemiller, 1973) สารไนโตรเจนจะช่วยเร่งให้เชื้อผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวได้หนาในระยะเวลาสั้น แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวของเชื้อ *Acetobacter* sp. ได้แก่ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และ แอมโมเนียมไดซัลเฟต ยังสามารถใช้สารไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ คือ beef extract, peptone, polypeptone, tryptone, yeast extract, casein, soybean hydrolysate, soytone, casamino acid และ corn steep liquor แต่การเลี้ยงเชื้อในอาหารน้ำมะพร้าว พบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้หากไม่เติมไนโตรเจนเลย ถึงแม้ว่าในน้ำมะพร้าวจะมีโปรตีนในรูปที่เชื้อสามารถใช้ได้

Oikawa, Morino, และ Ameyama (1995) ใช้ ทริปโทน(tryptone) ร่วมกับยีสต์สกัด (yeast extract)ในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum* พบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าที่ใช้ทริปโทน หรือยีสต์สกัดอย่างใดอย่างหนึ่ง

Oikawa และ คณะ (1995) ใช้พอลิเพปโทน (polypeptone) ร่วมกับ ยีสต์สกัดในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum* KU-1 พบว่า ให้ผลผลิตสูงกว่าเดิมถึง 2 เท่า

Yamanaka (1988) เลี้ยง *A. xylinum* AJ 12368 ลักษณะโคโลนีแบบขรุขระ (R-strain) ในแหล่งไนโตรเจนต่างๆ พบว่าการเติมถั่วเหลืองไฮโดรเซท (soybean hydrolysate)

0.25% และ ยีสต์สกัด (yeast extract) 0.5% เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารสังเคราะห์ จะให้แผ่นวุ้นที่มีความหนาสูงสุด 9 เซนติเมตร ทั้งนี้พบว่า ยีสต์สกัดและถั่วเหลืองไฮโดรไลเซทมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน วิตามินบี 12 วิตามินบี 6 แคลเซียมแพนโททีเนต ไบโอทิน ไนอาซิน อิโนซิทอล กรดไฟทิก และโคลีน

2.4.6 อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก

A. xylinum จะสร้างวุ้นน้ำมะพร้าวได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 28-32 องศาเซลเซียส (Lapus et al.,1967) การสร้างวุ้นจะสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเชื้อเป็นอย่างมาก ดังนั้นการสร้างแผ่นวุ้นก็จะเกิดได้เร็วเมื่อเชื้อเจริญดี Alaban,1962 เลี้ยง *A. xylinum* ในน้ำมะพร้าวโดยใช้อุณหภูมิบ่มเชื้อแตกต่างกันในช่วง 10-45 องศาเซลเซียส พบว่า การผลิตวุ้นจะเริ่มตั้งแต่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จนถึงช่วงอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อจะไม่สร้างวุ้น

2.4.7 เอทานอล

เนื่องจาก *Acetobacter* sp. สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดแอซีติกได้ แต่การสร้างวุ้นจะไม่เกิดขึ้นถ้าหากไม่มีกลูโคสในอาหาร นอกจากนี้ *Acetobacter* sp. ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเอทานอล ถ้าหากไม่มีการเติมกรดแอซีติก เกลือแอซิเตต หรือกลูโคสทั้งเอทานอล และ กรดแอซีติก เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ทำให้ผลผลิตสูงขึ้นในระยะเวลาสั้น นอกจากนั้นเอทานอลยังมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นซึ่งปนเปื้อนในกรรมวิธีการผลิตได้

2.4.8 ออกซิเจน

A. xylinum เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ(obligate acrobe) ดังนั้นปริมาณออกซิเจนมีส่วนสัมพันธ์กับการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตเซลลูโลสของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการหมักวุ้นจะเป็นแบบภาวะนิ่ง (static culture) ในการหมักเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญได้เร็วและสร้างวุ้นได้ดีจะต้องหมักในภาชนะที่มีผิวหน้ากว้าง เพื่อให้มีการซึมผ่านของออกซิเจนจุลินทรีย์จึงลอยตัวอยู่บนผิวหน้าของอาหารที่นิ่ง และเมื่อเชื้อมีจำนวนและความหนาแน่นในระดับหนึ่งแล้วก็จะเริ่มสร้างวุ้นขึ้น ในระหว่างการหมักควรวางภาชนะหมักนิ่งๆ แผ่นวุ้นที่สร้างขึ้นอาจจมลงได้เมื่อมีการกระทบกระเทือน ซึ่งเมื่อวุ้นแผ่นเดิมจมลงเชื้อจะสร้างวุ้นขึ้นมาที่ผิวหน้าใหม่ ซึ่งไม่ได้ความหนาตามต้องการ นอกจากนั้นใช้วัสดุที่สามารถระบายอากาศได้ดี

ปิดปากภาชนะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างการหมักเช่นกระดาษหนังสือพิมพ์ หรือผ้าขาวบาง จากปัจจัยที่กล่าวมาแล้ว พบว่าออกซิเจนก็เป็นปัจจัยหนึ่งในการเพิ่มปริมาณเซลลูโลสจากวุ้นน้ำมะพร้าวซึ่งมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว

2.5 <u>อิทธิพลของออกซิเจนต่อการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรีย</u>

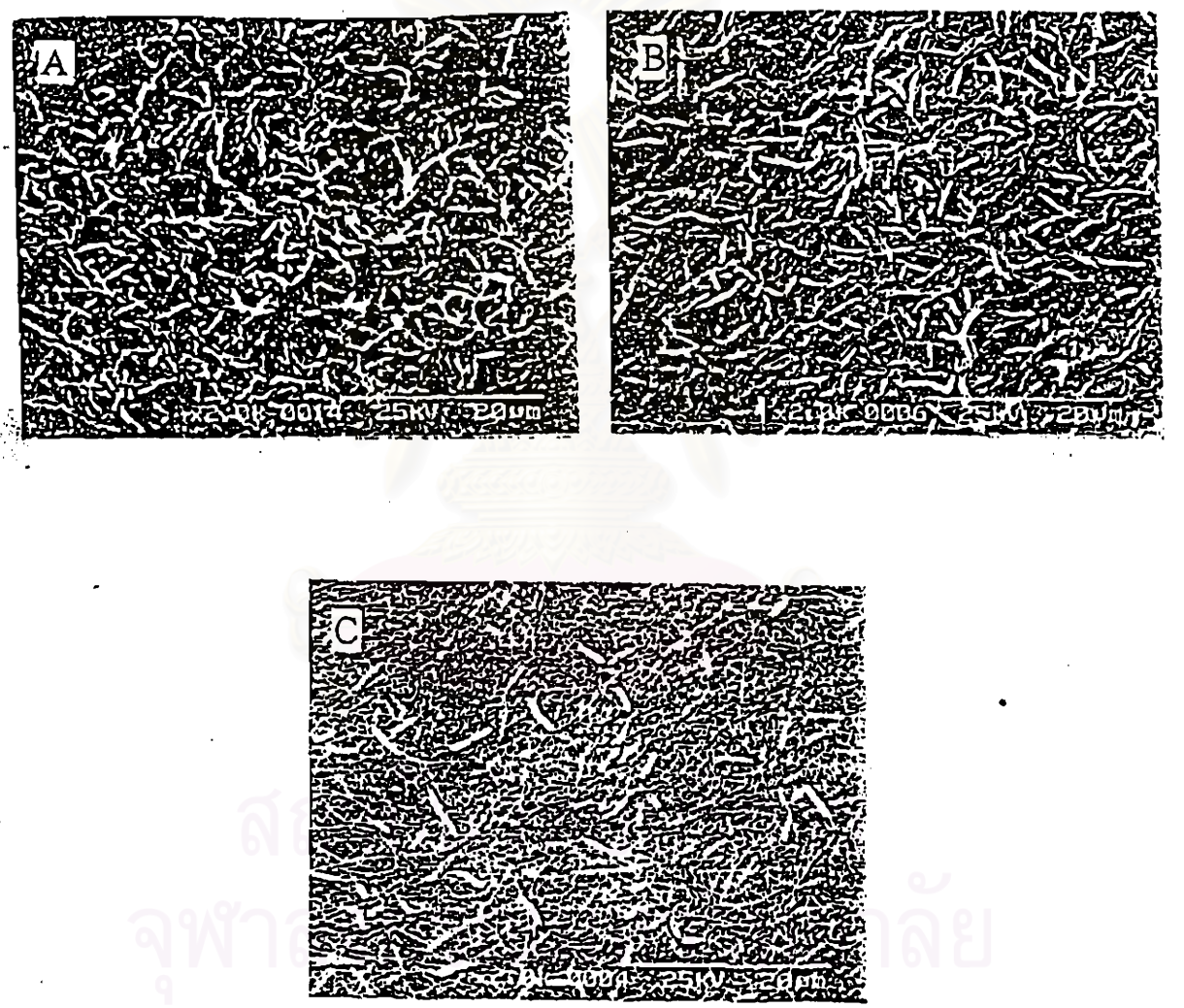
ออกซิเจนที่เข้าร่วมในกระบวนการเมตาบอลิสมภายในเซลล์แบคทีเรียจะอยู่ในรูปของโมเลกุลของออกซิเจนที่ละลายได้ (dissolved oxygen molecule : DO) ซึ่งออกซิเจนก็เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญอย่างหนึ่งของจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับ กลูโคส แต่ที่ออกซิเจนแตกต่างจากสารอาหารอื่น คือ การละลายของออกซิเจนในน้ำมีปริมาณจำกัด เช่น ในการหมักปกติสามารถละลายกลูโคสได้ถึง 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ออกซิเจนละลายได้น้อยกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการส่งผ่านออกซิเจนจากฟองอากาศเข้าสู่เซลล์มีหลายขั้นตอนคือ

1) การส่งผ่านออกซิเจนจากฟองอากาศให้ละลายเข้าไปในอาหารเหลว
2) การส่งผ่านออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวไปยังเซลล์จุลินทรีย์
3) การดูดซึมออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์

ซึ่งออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายของการสร้างสร้างพลังงาน จะถูกกระตุ้นโดย cytochrome oxidase ในกระบวนการหายใจ

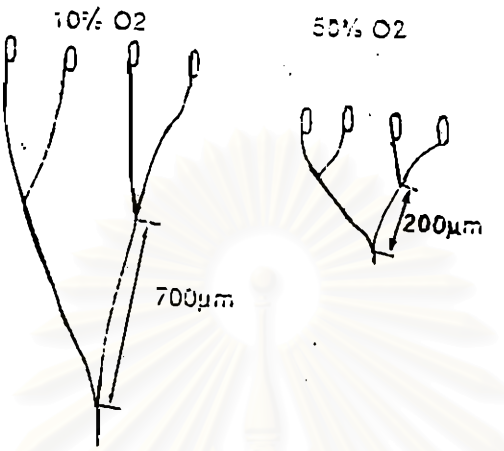
จากการค้นพบข้อมูลพบว่า ปริมาณออกซิเจนที่ละลายเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของ *A. xylinum* จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีการยืนยันถึงกลไกของออกซิเจนต่อการสร้างเซลลูโลส Watanabe และ Yamanaka (1995) ศึกษาถึงระดับการให้ออกซิเจนที่ผิวหน้า (oxygen tension) ในภาวะนิ่ง และสร้างสมการเพื่อคำนวณความยาวระหว่างจุดแตกกิ่งกับปริมาณออกซิเจนที่ให้ที่ผิวแผ่นวุ้น พบว่า การให้ออกซิเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อทั้งผลผลิตและลักษณะทางกายภาพของไฟบริล กล่าวคือ ความหนาของแผ่นวุ้นจะลดลงหากให้ออกซิเจนที่ผิวหน้าแก่แผ่นวุ้นมากขึ้น เมื่อดูด้วย scanning electron microscope พบว่าแผ่นวุ้นที่ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ระดับต่างๆ จะมีลักษณะปรากฏดังรูปที่ 5 พบว่าเมื่อให้ออกซิเจนที่ผิวหน้าที่ 50% เส้นใยจะสานกันเป็นร่างแหอย่างหนาแน่นมากกว่าที่ 10% และ 20 % แต่ไม่พบความแตกต่างของขนาดความกว้างของไฟบริล ซึ่งทำให้ทราบว่าการให้ออกซิเจนที่ผิวหน้าที่ระดับต่างๆ จะมีผลต่อความยาวระหว่างจุดแตกกิ่งของไฟบริล ดังรูป 6

จากการสมการที่ได้นำมาคำนวณ ทำให้ทราบว่าการให้ออกซิเจนที่ผิวหน้า ที่ ร้อยละ 10 และ 50 จะมีความยาว segment ระหว่างจุดแตกกิ่งของไฟบริล ประมาณ 700 และ 200 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งจะส่งผลให้สมบัติทางกายภาพ เช่นความหนาแน่นและความเหนียวของเส้นใยต่างกัน



รูปที่ 5 ภาพ scanning electron micrograph ของผิวหน้าแผ่นวุ้นที่แปรความเข้มข้นของออกซิเจนที่ระดับต่างๆ (A) 10% (B) 21% และ (C) 50%

ที่มา: Watanabe and Yamanaka (1995)



รูปที่ 6 การแตกกิ่งก้านของไฟบริลเซลลูโลสที่ความเข้มข้นออกซิเจนที่ผิวหน้าระดับ 10% และ 50%

ที่มา: Watanabe and Yamanaka (1995)

Joris และคณะ (1993) พยายามเพิ่มผลผลิตเซลลูโลสโดยการเขย่าเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้กับอาหารหมัก พบว่าการเขย่าทำให้เส้นใยกระจายไม่เกาะรวมกันเป็นแผ่นและผลผลิตลดลงร้อยละ 50 ของภาวะนิ่ง นอกจากนั้นการเพิ่มออกซิเจนจากการเขย่า ทำให้กลูโคสเปลี่ยนไปเป็นกลูโคนิกแทนการนำไปสร้างเซลลูโลสจึงทำการเติม microparticle หลายชนิด เช่น diatommaceous earth , silica gel, sea sand , small glass bead , และ loam พบว่าสามารถเพิ่มผลเซลลูโลสได้ถึง 4 เท่า

Yamanaka (1988) สันนิษฐานว่าการให้ออกซิเจนแก่อาหารหมักแบบนิ่งในการเลี้ยง *A. xylinum* จะช่วยให้เซลลูโลสสูงขึ้นดังนั้นจึงให้ออกซิเจน 2 วิธี ได้แก่ การให้ออกซิเจนแก่อาหารหมักที่ผิวหน้า (oxygen tension) ร้อยละ 21 30 50 และ 90 พบว่าหากเพิ่มความเข้มข้นออกซิเจนสูงกว่าร้อยละ 21 แผ่นวุ้นจะมีความหนาลดลง เรื่อยๆ ส่วนอีกวิธีนั้นเป็นการให้ออกซิเจนแก่อาหารหมักโดย ใช้เครื่องเขย่าที่มีการเคลื่อนที่กลับไปมาตามแนวราบ (reciprocal shaker) และ เครื่องเขย่าที่เคลื่อนที่โดยการหมุนเป็นแบบโรตารี (rotary shaker) เทียบกับการหมักในภาวะนิ่ง พบว่าในภาวะนิ่งจะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดจึงเสนอว่าออกซิเจนที่ความเข้มข้นสูงจะลดปริมาณการสร้างเซลลูโลสเนื่องจากความเป็นพิษของออกซิเจน

Okiyama และคณะ (1992) ได้พยายามเร่งการผลิตเซลลูโลสของ *A. xylinum* AJ12368 โดยทำการหมัก 2 ขั้นตอน โดยขั้นแรกเร่งให้มีการเจริญของเชื้อโดยทำการให้อากาศและมีการกวนในระหว่างการหมัก และพบว่าเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ของการเลี้ยง จากปริมาณเซลล์ 10^5 เป็น 10^7 และคงที่ในวันที่ 2 และ 3 หลังจากวันที่ 3 ปริมาณเซลล์ลดลง เมื่อหยุดให้อากาศในวันที่ 3 แล้วเลี้ยงต่อไปจนถึงวันที่ 10 ได้ปริมาณเซลลูโลสเท่ากับการเลี้ยงแบบนิ่งตั้งแต่เริ่มต้นโดยใช้เวลาหมัก 27 วัน

2.6 การใช้ Response Surface Methodology (RSM) ศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อภาวะการผลิต

Response Surface Methodology (RSM) เป็นวิธีทางวิทยาศาสตร์ร่วมกับทางสถิติ ซึ่งวางแผน และวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ศึกษากับค่าตอบสนองที่สนใจเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต การวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองที่มีหลายตัวแปรมักใช้วิธี Multiple Regression Analysis เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรและค่าตอบสนองในรูปของสมการทางคณิตศาสตร์ ซึ่งหากตัวแปรใดที่มีผลต่อการตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ตัวแปรนั้นจะปรากฏในสมการ โดยสมการที่ได้อาจเป็นสมการกำลังหนึ่ง (first-order model) ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง หรือสมการกำลังสอง (second-order model) ที่มีลักษณะเป็นเส้นโค้ง โดยการหาจุดที่เหมาะสมนั้นต้องสุ่มการทดลองเพื่อหาช่วงที่มีจุดเหมาะสม หากพบว่าผลที่ได้ยังห่างจากจุดเหมาะสมต้องเปลี่ยนตำแหน่งหรือช่วงการทดลองเพื่อให้ได้จุดที่เหมาะสมโดยพิจารณาทิศทางการเปลี่ยนตำแหน่งจากผลการทดลองเดิม และจากสมการที่สร้างขึ้นนี้สามารถนำมาสร้างกราฟ 3 มิติ ที่เรียกว่า Response Surface Plot ซึ่งแสดงระดับของตัวแปรในแนวระนาบและแสดงค่าตอบสนองในแนวแกนตั้ง หรือกราฟ 2 มิติที่เรียกว่า Contour Plot ซึ่งแสดงค่าตอบสนองในรูปเส้นกราฟหลายเส้นโดยกราฟทั้งสองประเภทนี้มีประโยชน์ในการอธิบาย ผลของของตัวแปรที่ศึกษาต่อค่าตอบสนอง ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ศึกษาและผลร่วมของตัวแปรที่ศึกษาต่อค่าตอบสนอง (Henika, 1982 ; Mason, Gunst, and Hess, 1989) ขั้นตอนในการวางแผนการทดลองแบบ RSM แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

2.6.1 กำหนดตัวแปรอิสระ (independent variable) ช่วงของตัวแปรอิสระ และผลตอบสนอง (Response)

ชนิดของตัวแปรอิสระที่จะนำมาทำการทดลองนั้นจะต้องมีผลต่อการตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่น ต้องการหาภาวะที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล อาจเลือกใช้ตัวแปรอิสระคือ ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น ปริมาณกล้าเชื้อ และอุณหภูมิภายในถังหมัก (Lewis and Kuiper, 1972 ; Nagatani, Shoda, and Aiba, 1968 ; Walsh and Martin, 1977) นอกจากจะต้องกำหนดชนิดของตัวแปรอิสระให้สอดคล้องกับการทดลองแล้วยังต้องกำหนดช่วงการทดลองด้วย ซึ่งช่วงการทดลองนี้หากกำหนดแคบหรือกว้างเกินไปจะมีผลต่อเส้นกราฟทำให้มีลักษณะเป็นเส้นตรงยากต่อการทำนายทิศทาง ซึ่งจะต้องเปลี่ยนช่วงการทดลองเพื่อให้ได้จุดที่เหมาะสมโดยพิจารณาทิศทางการเปลี่ยนตำแหน่งจากการทดลองเดิม

2.6.2 กำหนดแบบแผนการทดลอง

แผนการทดลองที่เหมาะสมสำหรับวิธี RSM มีหลายแบบโดยทั่วไปจะใช้ Fractional Factorial Design คือ เลือกบางจุดที่สามารถทำนายผลได้อย่างครอบคลุม และมีประสิทธิภาพโดยไม่ทำการทดลองทุกจุด ช่วงที่ทดลองส่วนใหญ่จะทำการทดลองที่จุดกึ่งกลาง จุดสูงสุด และจุดต่ำสุดของตัวแปรอิสระ เพื่อที่จะทำนายผลจากช่วงการทดลองนี้แบบแผนการทดลองที่เหมาะสมกับ RSM มี 2 แบบ คือCentral Composite Design และ Box-Behnken Design ซึ่งเป็นแบบแผนการทดลองที่สามารถใช้ในRSM เพื่อทำนายผลการทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีการทดลองจำนวนไม่มากนัก เช่นการศึกษา 3 ตัวแปร แต่ละตัวแปรมี 3 ระดับ โดยจะมีการทดลองทั้งหมด 15 การทดลอง ซึ่งทำการกระจายจุดกึ่งกลางไปในทิศทางต่างๆ สำหรับ Box-Behnken Design และ 17 การทดลองสำหรับ Central Composite Design ซึ่งกระจายการทดลองเป็น 3 มิติคล้ายรูปกล่องสี่เหลี่ยม ดังนั้น การเลือกแบบใดแบบหนึ่งมาใช้ในการออกแบบการทดลอง จะเป็นการลดเวลาและประหยัดค่าใช้จ่ายในการทดลองเป็นอย่างดี (Henika,1982 ; Mason, Gunst, and Hess , 1989)

2.6.3 วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

นำข้อมูลของค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลองด้วยแบบแผนการทดลองที่เหมาะสมมาหาความสัมพันธ์กับตัวแปรอิสระที่ต้องการศึกษา โดยวิธี Multiple Regression ในรูปสมการกำลังสองรูปแบบที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ คือสมการพอลิโนเมียลกำลังสองซึ่งมีรูปแบบโดยทั่วไป ดังนี้

$$Y = Bo + \sum_{I=1}^{k} B_I X_I + \sum_{I=1}^{k} B_{II} X_I^2 + \sum_{I=1}^{k} \sum_{I=I+1}^{k} B_{II} X_I X_I$$

เมื่อ Y คือ ค่าตอบสนองที่เกิดจากการแปรค่าตัวแปร

Bo คือ ค่าคงที่

$\sum_{I=1}^{k} B_I X_I$ คือ เทอมที่แสดงถึงอิทธิพลของตัวแปรอิสระ X_I

$\sum_{I=1}^{k} B_{II} X_I^2$ คือ เทอมที่แสดงถึงอิทธิพลของกำลังสองของตัวแปรอิสระ

$\sum_{I=1}^{k} \sum_{I=I+1}^{k} B_{II} X_I X_I$ คือ เทอมที่แสดงถึงอิทธิพลร่วมของตัวแปรอิสระ 2 ตัวแปร

K คือ จำนวนตัวแปรอิสระ

เนื่องจาก สามารถอธิบายผลของตัวแปรอิสระที่มีต่อค่าตอบสนอง (linear effect) ผลของความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระที่มีต่อค่าตอบสนอง (Interaction effect) และผลร่วมของตัวแปรอิสระที่มีต่อค่าตอบสนองได้ จากสมการดังกล่าว เมื่อได้ตัวแปรที่มีผลต่อค่าตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญแล้ว จะสามารถสร้างกราฟ Contour plot โดยอาศัยโปรแกรมสำเร็จรูปได้ กราฟ Contour plot จะมีลักษณะเป็นอนุกรมของเส้นตรงหรือเส้นโค้ง ซึ่งแสดงภาวะซึ่งให้ค่าตอบสนองที่คงที่ มีหลายรูปแบบขึ้นกับความสัมพันธ์ระหว่างค่าตัวแปรอิสระกับค่าตอบสนอง ดังนั้นจาก Contour plot ที่ได้ ทำให้สามารถเลือกภาวะของตัวแปรที่ให้ค่าตอบสนองที่เหมาะสมตามที่ต้องการได้