

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกและการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียกรดแอสติก ที่ทนอุณหภูมิสูง
(Isolation and characterization of thermotolerant acetic acid bacteria)

โดย นางวัชรา กาญจนรัช

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย
จากงบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2548
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ชื่อเรื่อง การแยกและการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียกรดแอซิดิก ที่ทนอุณหภูมิสูง
ผู้วิจัย นางวัชรรา กาญจนรัช

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เพื่อศึกษา *Acetobacter* สายพันธุ์ที่ทนความเข้มข้นของกรดแอซิดิก และแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิสูง และศึกษาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสและอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน membrane fractions จากการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแอซิดิกจากผลไม้และดอกไม้จำนวน 70 ไอโซเลตมาศึกษาการทนต่อกรดแอซิดิก 1-4 เปอร์เซ็นต์และ แอลกอฮอล์ 1-15 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่า 3 และ 1 ไอโซเลตสามารถเจริญในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 2.5 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียสตามลำดับ และพบ 1 ไอโซเลตสามารถเจริญในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 2.0 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส การทนต่อ แอลกอฮอล์ พบ จำนวน 30 ไอโซเลตสามารถเจริญในอาหารที่มี แอลกอฮอล์ 8.0 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแอซิดิกจำนวน 3 ไอโซเลตที่สามารถเจริญในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 2.5 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 40 และ 42 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญในอาหารที่มีแอลกอฮอล์ 8.0 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลต FI24 และ Fr63 มีสมบัติตรงกับ *Acetobacter aceti* และ ไอโซเลต Fr56 มีสมบัติตรงกับ *Acetobacter pasteurianus* เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสและอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน membrane fraction ของ *A. aceti* FI24, *A. pasteurianus* Fr56, *A. aceti* Fr63, and *A. aceti* IFO3284 ที่เจริญบนอาหาร seed culture ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า *A. aceti* FI24, *A. pasteurianus* Fr56 และ *A. aceti* Fr63 มีกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเท่ากับ 1.7, 3.2 และ 1.3 unit/mg ตามลำดับ ขณะที่ *A. aceti* IFO3284 มีกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 2.9 unit/mg และ *A. aceti* FI24, *A. pasteurianus* Fr56 และ *A. aceti* Fr63 มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส เท่ากับ 1.0, 0.9 และ 0.9 unit/mg ตามลำดับ ขณะที่ *A. aceti* IFO3284 มีกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 1.1 unit/mg นอกจากนี้เมื่อศึกษา protein content ใน membrane fraction ของ *A. aceti* FI24, *A. pasteurianus* Fr56 และ *A. aceti* Fr63 ที่เจริญบนอาหาร seed culture ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบแถบโปรตีนหนาขึ้นที่น้ำหนักโมเลกุล 22 Kda

Title Isolation and characterization of thermotolerant acetic acid bacteria

Name Mrs. Watchara Kanchanarach

Abstract

This investigation is to find *Acetobacter* strains which can tolerate high concentration of acetic acid and ethanol at high temperature and to characterize their membrane-bound alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in membrane fractions.

A total of seventy isolates of acetic acid bacteria isolated from fruits and flowers were investigated for their toleration to 1-4% acetic acid and 1-15% ethanol at 30, 37, 40, and 42°C. It was found that three and one isolates could grow in medium containing 2.5% acetic acid at 37 and 40°C, respectively. One isolate could grow in medium containing 2.0% acetic acid at 42°C. Regarding toleration to ethanol it was observed that thirty isolates could grow in medium containing 8.0% ethanol at 37°C. Identification of three isolates could grow in medium containing 2.5% acetic acid at 40 and 42°C and 8.0% ethanol at 37°C showed that isolates Fl24 and Fr63 were identified as *Acetobacter aceti* and isolate Fr56 was identified as *Acetobacter pasteurianus*. The ADH and ALDH activities of *A. aceti* Fl24, *A. pasteurianus* Fr56, *A. aceti* Fr63, and *A. aceti* IFO3284 grown on seed culture medium at 37 °C were measured with the membrane fractions. It was found that The ADH activities of *A. aceti* Fl24, *A. pasteurianus* Fr56, and *A. aceti* Fr63 were 1.7, 3.2, and 1.3 units/mg, respectively. While *A. aceti* IFO3284 was 2.9 units/mg. The ALDH activities of *A. aceti* Fl24, *A. pasteurianus* Fr56, and *A. aceti* Fr63 were 1.0, 0.9, and 0.9 units/mg, respectively. Whereas *A. aceti* IFO3284 was 1.1 units/mg. Besides protein content in the membrane fractions of *A. aceti* Fl24, *A. pasteurianus* Fr56, and *A. aceti* Fr63 grown on seed culture medium were increased at 37 °C, especially protein band at MW. Of 22 Kda.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2548 มหาวิทยาลัย
มหาสารคามผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาที่อนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยและ
ขอขอบคุณ Professor Dr. Kazunobu Matsushita และภาควิชา Biological chemistry มหาวิทยาลัย
Yamaguchi ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนในการทำวิจัยศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ alcohol
dehydrogenase และ aldehyde dehydrogenase ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีดำเนินงานวิจัย	17
ผลการดำเนินงาน	22
สรุป	34
บรรณานุกรม	36
ภาคผนวก	39

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียกรดแอซิดิกในจีนัส <i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> และ <i>Acidomonas</i>	3
2 ความแตกต่างของแบคทีเรียในจีนัส <i>Asaia</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Acidomonas</i> , <i>Gluconobacter</i> และ <i>Gluconacetobacter</i>	9
3 การแยกเชื้อและลักษณะของแบคทีเรียกรดแอซิดิก	22
4 การทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นกรดแอซิดิกและแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 30,37, 40 และ 42 องศาเซลเซียส	26
5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรียกรดแอซิดิกที่ทนกรด แอลกอฮอล์ และทนอุณหภูมิสูง	30

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (ADH) และ อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (ALDH) จาก membrane fraction ของ <i>A. ceti</i> Fl 24, <i>A. pasteurianus</i> Fr 56, <i>A. ceti</i> Fr 63 และ <i>A. aceti</i> IF 03284 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร seed culture ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส	32
2	SDS-PAGE จาก membrane fraction ของ <i>A. ceti</i> Fl 24, <i>A. pasteurianus</i> Fr 56, <i>A. ceti</i> Fr 63 และ <i>A. aceti</i> IF 03284	33

บทที่ 1

บทนำ

น้ำส้มสายชู หรือกรดน้ำส้ม หมายถึง กรดแอซติก (acetic acid) ที่ได้มาจากกระบวนการหมักที่มีแอลกอฮอล์ (alcohol) น้ำส้มสายชูเป็นของเหลวใส ซึ่งอาจจะไม่มีสี หรือมีสีของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก โดยส่วนประกอบของน้ำส้มสายชูขึ้นอยู่กับสารประกอบในวัตถุดิบที่ใช้ ความหนาแน่น จุดเดือด จุดเยือกแข็ง แรงตึงผิว และความหนืดของน้ำส้มสายชูอาจจะมากหรือน้อยกว่าของน้ำบริสุทธิ์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดอะซิติกและวัตถุดิบที่ใช้แต่ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) จะมีค่าระหว่าง 2-3.5 (กำเนิด, 2534)

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแอซติก (acetic acid forming bacteria) ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล (genus) *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองสกุลนี้สามารถออกซิไดซ์ (oxidise) แอลกอฮอล์ไปเป็นกรดแอซติกได้ แต่ต่างกันที่ *Acetobacter* จะเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดแอซติกได้ปริมาณมากกว่า และพวกนี้สามารถออกซิไดซ์กรดแอซติกต่อไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ จึงเรียกแบคทีเรียพวกนี้ว่า “overoxidiser” ส่วน *Gluconobacter* เปลี่ยนเอทานอลให้เป็นกรดแอซติกได้ต่ำกว่า และพวกนี้ไม่สามารถออกซิไดซ์กรดแอซติกต่อไปได้ จึงเรียกว่า “underoxidiser” ความสามารถในการออกซิไดซ์เอทานอล ให้ไปเป็นกรดแอซติกนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตน้ำส้มสายชู ซึ่งมีรสเปรี้ยวที่เกิดจากกรดแอซติกเป็นส่วนใหญ่ และตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมต้องมีกรดแอซติกไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ดังนั้นในการผลิตน้ำส้มสายชูจึงเลือกใช้ *Acetobacter* โดยใช้สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดแอซติกได้สูงกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ส่วน *Gluconobacter* จะไม่ใช่เนื่องจากให้ปริมาณกรดแอซติกต่ำ (วิลาวัลย์, 2539)

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นมีพืชและผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เป็นแหล่งที่พบแบคทีเรียกรดแอซติก เช่น พบในน้อยหน่า ส้ม สับปะรด กัลย เงาะ ผลตาลสุก กล้วย ฝรั่ง ชมพู มะละกอ ขนุน ผลจันทน์ ระกำ พุทรา และอาโวคาโด นอกจากนี้ยังอาจแยกแบคทีเรียกรดแอซติก ได้จากดอกไม้ น้ำส้มสายชูหมักที่ยังไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ ผลิตภัณฑ์จากการหมักสับปะรด น้ำตาลมะพร้าว เหล้าขาว สาโท น้ำตาลเมา ข้าวหมาก ลูกแป้งข้าวหมาก และลูกแป้งเหล้า ซึ่งเชื้อแบคทีเรียกรดแอซติก ที่แยกได้นี้ มีหลายสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการทนอุณหภูมิสูงและทนต่อกรดแอซติกที่เชื้อสร้างขึ้นซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำส้มสายชูหมัก ในการหมักน้ำส้มสายชูนั้น

จะใช้แอลกอฮอล์เป็นวัตถุดิบ หลังจากหมักแล้วจะได้ผลผลิต คือ กรดแอซิดิก หรือ กรดน้ำส้ม โดยอาศัยปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็นปฏิกิริยาออกซิโดซ์แอลกอฮอล์ให้เป็นอัลดีไฮด์โดยอาศัยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase, ADH) ขั้นที่ 2 เป็นการออกซิโดซ์อัลดีไฮด์ให้กลายเป็นกรดน้ำส้ม โดยใช้เอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Aldehyde dehydrogenase, ALDH) (Ameyama and Adachi, 1982a,b) เนื่องจากการผลิตน้ำส้มสายชูในระดับอุตสาหกรรมโดยอาศัยกระบวนการหมักอย่างต่อเนื่องจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิให้คงที่เพื่อให้ได้ปริมาณกรดสูงสุด โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักคือ 30 องศาเซลเซียส การที่อุณหภูมิในการหมักเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยมีผลให้อัตราการหมัก และปริมาณของน้ำส้มสายชูลดลง (Ohmori et al, 1980) โดยปกติในการออกซิโดซ์ เอทานอลให้เป็นอัลดีไฮด์ และกรดน้ำส้ม จะมีการปล่อยพลังงานความร้อนออกมาทำให้ต้องใช้ระบบหล่อเย็น (cooling system) เพื่อควบคุมอุณหภูมิการหมักให้คงที่ ดังนั้นการนำเชื้อแบคทีเรียกรดแอซิดิกที่ทนอุณหภูมิสูงมาใช้จะเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยลดค่าใช้จ่ายเรื่องระบบหล่อเย็นได้อย่างมากโดยเฉพาะกับอากาศในประเทศไทย ดังนั้นจึงได้มีการแยกและคัดเลือกแบคทีเรีย กรดแอซิดิกจากผลไม้และดอกไม้ นำมาศึกษาความสามารถในการผลิตกรด การทนอุณหภูมิสูง ทนกรดและแอลกอฮอล์ ศึกษาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และ อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งความรู้เหล่านี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่องานวิจัยพื้นฐาน รวมทั้งเป็นแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ให้ดียิ่งขึ้นและนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแอซิดิก จากผลไม้และดอกไม้ที่สามารถทนความเข้มข้นของกรดแอซิดิก แอลกอฮอล์ และทนอุณหภูมิสูง และจัดจำแนกในระดับสปีชีส์
2. เพื่อศึกษาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสและอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส จากแบคทีเรียที่ทนความเข้มข้นของกรดแอซิดิก แอลกอฮอล์ และทนอุณหภูมิสูง
3. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยและพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการทำวิจัย
2. ข้อมูลที่ได้นำมาศึกษาต่อโดยการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และปรับปรุงสายพันธุ์ทางพันธุวิศวกรรมซึ่งเป็นโครงการวิจัยที่นำไปสู่การพัฒนาที่สำคัญในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแอซิดิก

ตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ninth edition (Holt และคณะ, 1994) และงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสาร International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) ได้แบ่งแบคทีเรียกรดแอซิดิกออกเป็น 5 จีแนส (genus) ซึ่งทั้ง 5 จีแนสนี้ถูกจัดไว้ในแฟมิลี (family) Acetobacteraceae ดังแสดงในตารางที่ 1 และตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียกรดแอซิดิกในจีแนส *Acetobacter*, *Gluconobacter* และ *Acidomonas*

Characteristics	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acidomonas</i>
Motility	+ or -	+ or -	-
Flagella arrangement :			
polar	-	+	-
peritrichous	+	-	-
Overoxidation of ethanol	+	-	-
Oxidation of DL-lactate to CO ₂ and H ₂ O	+	+	-
Oxidation of acetate to CO ₂ and H ₂ O	+	-	+
Ketogenesis	+ or -	+	-
Formation of brown water-soluble pigment on GYC agar	-	-	-
Growth factors required	+ or -	+	-
Products formed from D-glucose :			
2-Ketogluconic acid	+ or -	+	-
5-Ketogluconic acid	+ or -	+	-
2,5-Diketogluconic acid	+ or -	+ or -	-

ตารางที่ 1 (ต่อ) ลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียกรดแอซิดิกในจินัส *Acetobacter*, *Gluconobacter* และ *Acidomonas*

Characteristics	Acetobacter	Gluconobacter	Acidomonas
Acetylmetylcarbinol (Voges-Proskauer)	-	+ or -	-
Growth in presence of 30%glucose	+ or -	-	-
Growth on Frateur’s Hoyer manitol medium	-	-	-
Acid produced from :			
D-Arabinose	-	+	-
i-Inositol	-	+ or -	-
Maltose	-	+ or -	-
Carbon source for growth :			
L-Arabinose	-	-	-
D-mannose, D-Xylose, L-Xylose	-	-	-
n-Propanol	+ or -	-	-
Acetate	+ or -	-	+
Glycerate	+ or -	-	-
Lactate	+ or -	-	-
D-Mannitol	+	+	-
Methanol	-	-	+
Oxidase test	-	-	+

+ or - , reaction differs among species or among strains with in species.

ที่มา Holt และคณะ (1994)

แฟมิลี (Family) Aetobacteraceae (Gill และ Deley, 1980)

เชื้อแบคทีเรียที่จัดอยู่ในแฟมิลีนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) หรือ gram variable เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน เซลล์อยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสาย อาจพบเซลล์ที่มีรูปร่างลักษณะกลม (sphericle) ยืดยาว (elongated) บวม (swollen) ทรงกระบอ (club shape) หรือเป็นเส้นสาย (filamentous) เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) แฟลกเจลลาที่อยู่ขั้วเซลล์ (polar flagella) มีจำนวน 1-8 แฟลกเจลลา หรือไม่เคลื่อนที่ไม่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ต้องการอากาศ (aerobic) เพื่อการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ซึ่งจะใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron acceptor) เป็นพวกเคโมออร์แกโนโทรฟิก (chemoorganotrophic) สามารถสร้างเอนไซม์แคตะเลส (catalase positive) ยกเว้น *A. pasteurianus* subsp. *paradoxus* และ *A. peroxydan* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase negative) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียส ช่วงความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 5-6 ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน (gelatin) ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรตได้ ไม่สร้างอินโดล (indole negative) สามารถออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดแอซิติกได้ในสภาพที่เป็นกลางและเป็นกรด (pH 4.5) ส่วนใหญ่เจริญในอาหารที่มีกลูโคส (D-glucose) หรือ ไซโลส (D-xylose) แล้วทำให้อาหารมีความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 4.5 พบได้ในน้ำตาล และแอลกอฮอล์ที่เป็นกรดเล็กน้อย เช่น ผลไม้ ดอกไม้ เบียร์ ไวน์ น้ำแอปเปิ้ลหมัก น้ำส้ม ผัก และน้ำผัก mol% G+C ของ DNA อยู่ในช่วง 51-56

แฟมิลี Acetobacteraceae สามารถจำแนกออกได้เป็น 5 จีนัส ดังนี้

1. Genus *Acetobacter*

เป็นแบคทีเรียที่เซลล์มีรูปร่างรี (ellipsoidal) ถึงเป็นท่อน (rod shape) ตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีขนาด 0.6-0.8 x 1.0-4.0 ไมโครเมตร เซลล์อาจอยู่แบบเดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรืออยู่ต่อกันเป็นสาย บางสายพันธุ์อาจมีรูปร่างเซลล์ลักษณะกลม ยืดยาวออก บวม รูปกระบอโค้ง หรือเป็นสาย มีทั้งสามารถเคลื่อนที่ได้ และเคลื่อนที่ไม่ได้ พวกที่เคลื่อนที่ได้จะมีแฟลกเจลลาอยู่บริเวณด้านขั้วเซลล์ หรืออยู่รอบเซลล์ ไม่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ เซลล์ติดสีแกรมลบ (มีส่วนน้อยที่ติดสี gram variable) เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต (obligately aerobic) ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ (pigments) มีบางสายพันธุ์ที่สร้างรงควัตถุน้ำตาลที่ละลายน้ำได้ หรือโคโลนี (colony) สีม่วงเนื่องจากสารพอร์ไฟรินส์ (porphyrins) สามารถสร้างเอนไซม์แคตะเลส (catalase positive) ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase negative) ไม่ย่อยสลายเจลาติน ไม่สร้างอินโดล (indole negative) และไฮโดรเจนซัลไฟด์

(H₂S) สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดน้ำส้มได้ สามารถออกซิไดซ์แอซิเตท (acetate) และแลคเตท (lactate) ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และน้ำ (H₂O) แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของเชื้อ คือ เอทานอล กลีเซอรอล (glycerol) และแลคเตท สามารถสร้างกรดได้จาก เอทานอล, เอ็น-โพรพานอล (n-propanol), เอ็น-บิวทานอล (n-butanol) และกลูโคส ไม่ย่อยสลายแลคโตส (lactose) และแป้ง (starch) จัดเป็นพวกเคโมออร์แกโนโทรฟ (chemoorganotroph) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียส ช่วงความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 5.4-6.3 สามารถพบ *Acetobacter* spp. ในผลไม้ ดอกไม้ น้ำผึ้ง สาเก ไวน์ปาล์ม ไวน์องุ่น น้ำแอปเปิ้ลหมัก น้ำส้มสายชู เป็นต้น *Acetobacter* บางชนิดทำให้เกิดโรคสีชมพู (pink disease) ในสับปะรด และโรคเน่า (rot) ในแอปเปิ้ล และลูกแพร์ บางชนิดสามารถดำรงชีวิตได้โดยการตรึงไนโตรเจน (microaerophilic nitrogen fixer) โดยพบอยู่บริเวณราก และลำต้นของอ้อย (sugarcane)

2. Genus *Gluconobacter*

เป็นแบคทีเรียที่เซลล์มีรูปร่างรี ถึงเป็นท่อน มีขนาด 0.5-0.8 x 0.9-4.2 ไมโครเมตร อาจพบเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรืออยู่เป็นคู่ ไม่ค่อยพบต่อกันเป็นสาย ไม่สร้างเอนโดสปอร์ เซลล์ติดสีแกรมลบ (มีส่วนน้อยเป็น gram variable) มีทั้งเคลื่อนที่ ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ พวกที่เคลื่อนที่ได้จะพบแฟลกเจลลาที่ขั้ว 3-8 เส้น ไม่ค่อยพบว่ามีแฟลกเจลลาเดี่ยว ต้องการออกซิเจน เมแทบอลิซึม (metabolism) จากการหายใจ ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron acceptor) สามารถรีดิวส์ไรโอซัลเฟตให้อยู่ในรูปไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ในอาหารที่ประกอบด้วยซอร์บิทอล (sorbitol medium) ที่มีไรโอซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ โคโลนีสีซีด อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ช่วงความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 5.5-6 ส่วนใหญ่เจริญได้ที่ช่วงความเป็นกรดต่าง 3.6 มีเอนไซม์แคตะเลส (strongly catalase positive) ไม่มีเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรท (nitrate) ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน (gelatin negative) ไม่สามารถสร้างอินโดล จัดเป็นพวกเคโมออร์แกโนโทรฟ สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดแอซิกได้ ไม่สามารถออกซิไดซ์แอซิเตท (acetate) หรือแลคเตท (lactate) เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ เกิด strong ketogenesis จากโพลีแอลกอฮอล์ (polyalcohols) สามารถสร้างกรดจากกลูโคส, โซโลส ทุกสายพันธุ์สร้าง 2-ketogluconic acid จากกลูโคส และส่วนมากจะสร้าง 5-ketogluconic acid ไม่สามารถสร้างกรด หรือเจริญอยู่บนแลคโตส หรือสารละลายแป้ง (soluble starch) *Gluconobacter* สามารถพบในดอกไม้ ดินสวน baker's yeast น้ำผึ้ง ผล

ไม้ น้ำแอปเปิลหมัก เบียร์ ไวน์ ไวน์น้ำส้มสายชู (wine vinegar) บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคสีชมพู (pink disease) ในสปีปะรด และทำให้เกิดโรคเน่า (rot) ในแอปเปิล และลูกแพร์ *Gluconobacter* ชอบเจริญอยู่ในบริเวณที่มีน้ำตาลปริมาณมากตรงข้ามกับ *Acetobacter* ที่เจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีแอลกอฮอล์มาก

3. Genus *Acidomonas*

เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อนจนถึงกลม เซลล์ติดสีแกรมลบ มีขนาด 0.8-1.0 x 1.5-3.0 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรืออยู่เป็นคู่แต่พบได้น้อย เซลล์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โคลินที่เจริญบนอาหารที่มีองค์ประกอบเป็น peptone, yeast extract, malt extract จะมีลักษณะเป็นมันวาว (shiny), ผิวเรียบ (smoot), หนาสูง (raised), ขอบโคโลนีเรียบ (entire) มีสีขาวจนถึงเหลือง หากเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โคลินี้จะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร สร้างรงควัตถุเรืองแสงที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ ต้องการอากาศในการดำรงชีวิต ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตรต์ (nitrite) ได้ ไม่สร้างอินโดล และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน และแป้งได้ สามารถผลิตแอมโมเนียได้ ไม่สร้างสารไดไฮดรอกซีอะซิโตน (dihydroxyacetone) จากกลีเซอรอล สามารถสร้างกรดจากเอทานอลได้ สามารถสร้างกรดจากกลูโคส แต่ไม่สร้างกรดจากอะราไบโนส (L-arabinose), ไซโลส (D-xylose), ฟรุคโตส (D-fructose), แลคโตส (D-galactose), มอลโตส (maltose), ซูโครส (sucrose), แลคโตส, ทรีฮาโลส (trehalose), ซอร์บิทอล (D-sorbitol), แมนนิทอล (D-mannitol), ไอโนสิทอล (inositol), กลีเซอรอล หรือสารละลายแป้ง สามารถใช้เมทานอล (methanol), เอทานอล (ethanol), กรดแอซติก (acetic acid), กลูโคส (D-glucose), กลีเซอรอล (glycerol) และเพคติน (pectin) เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อให้ได้พลังงาน และใช้ในการเจริญ แต่ไม่สามารถใช้อะราไบโนส (L-arabinose), ไซโลส (D-xylose), ฟรุคโตส (D-fructose), แลคโตส (D-galactose), มอลโตส (maltose), ซูโครส (sucrose), แลคโตส (lactose), ทรีฮาโลส (trehalose), ซอร์บิทอล (D-sorbitol), แมนนิทอล (D-mannitol), ไอโนสิทอล (inositol), สารละลายแป้ง (soluble starch), กรดซิตริก (citric acid), กรดแลกติก (lactic acid), เมทิลเอมีน (methylamine), มีเทน (methane) หรือไฮโดรเจน บางสายพันธุ์ใช้แมนโนส (D-mannose) ได้ในปริมาณน้อย สามารถใช้แอมโมเนีย (ammonia), ไนเตรท, และยูเรีย (urea) เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตเอนไซม์แคตะเลส, ออกซิเดส และยูรีเอส (urease) ความเป็นกรดต่ำที่เจริญได้คือ 2.0 และ 5.5 และเจริญได้ดีในความเป็นกรดต่ำ 3.0 และ 5.0 ไม่เจริญที่ความเป็นกรดต่ำมากกว่า 6 หรือ น้อยกว่า 1.5 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ไม่เจริญ

ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ไม่เจริญบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 3 เปอร์เซ็นต์ ภายในเซลล์ มีกรดไขมัน (fatty acid) ที่ประกอบด้วยสายตรงของกรดไขมันอิ่มตัวจำนวนมาก คือ $C_{18:1}$ และมีพวก กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเป็นสายตรงในจำนวนน้อย คือ $C_{15:0}$, $C_{16:0}$, $C_{17:0}$, $C_{18:0}$ และ $C_{19:0}$ กรดไขมันสายตรงที่ไม่อิ่มตัว คือ $C_{16:1}$ และ $C_{19:0}$ กรดไซโครโอฟีน (cyclopentane acid), กรดไฮดรอกซี (hydroxy acid) ที่ประกอบด้วย 3-OH $C_{14:0}$, 3-OH $C_{16:0}$, 2-OH $C_{14:0}$ และ 2-OH $C_{16:0}$ ระบบยูบิควิโนน (ubiquinone) คือ Q-10 ร่วมกับ Q-9 และ Q-10

4. Genus *Gluconacetobacter*

เชื้อแบคทีเรียกรดแอซิดิกในจินัสนี้เดิมจัดอยู่ในจินัส *Acetobacter* subgenus

Gluconoacetobacter เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยระบบยูบิควิโนน ซึ่งจัดเป็น Q-10 แตกต่างจากเชื้อกรดน้ำส้มที่อยู่ใน subgenus *Acetobacter* ซึ่งมีระบบยูบิควิโนนเป็น Q-9 (Yamada และ Kondo, 1984) เมื่อมีการจัดจำแนกเชื้อกรดน้ำส้ม โดยอาศัยลำดับเบสบางส่วนของ 16S rRNA เชื้อกรดน้ำส้ม subgenus นี้ จึงถูกแยกออกมาเป็นจินัส *Gluconacetobacter* (Yamada และคณะ, 1997) เนื่องจากมีลำดับเบสแตกต่างจากจินัสเดิมที่จำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ninth edition

เชื้อแบคทีเรียกรดแอซิดิกในจินัสนี้ มีลักษณะส่วนใหญ่คล้ายคลึงกับจินัส *Acetobacter* ดังแสดงในตารางที่ 2 ยกเว้นสามารถสร้างกรดจากการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน มี % G+C ของ DNA ระหว่าง 55-66 เปอร์เซ็นต์ และมีระบบยูบิควิโนนเป็นชนิด Q-10

5. Genus *Asaia* (Yamada และคณะ, 2000)

เชื้อแบคทีเรียกรดแอซิดิกในจินัสนี้มีลักษณะที่แตกต่างจากอีก 4 จินัส โดยไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกรดแอซิดิกเป็นองค์ประกอบ (ตารางที่ 2) แต่มีลำดับเบสของ 16S rRNA อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแอซิดิกมี 1 สปีชีส์ คือ *Asaia bogorensis* เป็นแบคทีเรียกรดแอซิดิกที่แยกในประเทศอินโดนีเซีย จากดอกของกล้วยไม้ชนิด *Bauhinia purpuria* ดอกของต้น plumbago (*Plumbago auriculata*) และจาก Tape ketan ซึ่งเป็นข้าวเหนียวหมักลักษณะคล้ายข้าวหมากของประเทศไทย นอกจากนี้ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีกรดแอซิดิกแล้ว ลักษณะเด่นที่แตกต่างจากอีก 4 จินัส คือ สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลคัลซิทอล (Dulcitol) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความแตกต่างของแบคทีเรียในจีนัส *Asaia*, *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconobacter*
และ *Gluconacetobacter*

Character	<i>Asaia</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acidomonas</i>	<i>Gluconacetobacter</i>
Flagellation	Peritrichous or non	Peritrichous or non	Polar or non	Non	Peritrichous or non
Oxidation of :					
Acetate	+	+	-	+	+ or -
Lactate	+	+	-	-	+ or -
Growth on methanol	-	-	-	+	-
Assimilation of ammonium sulfate on glucose medium	+	w+	-	-	w+
Growth on :					
Glutamate agar	+	+ or -	-	-	+ or -
Mannitol agar	+	- or +	+	-	+ or -
Dihydroxyacetone from glycerol	- or w+	- or w+	+	-	+ or -
Acetic acid production on ethanol-CaCO ₃ agar	- or w+	+	+	+	+
Growth on acetic acid- containing medium (0.35% acetic acid)	-	+	+	+	+
Acid production from :					
D-mannitol	+ or -	- or w+	+	-	+ or -
D-Sorbitol	+ or -	-	+	-	-
Dulcitol	+	-	-	-	-
Glycerol	+	-	+	-	+
Ethanol	- or w+	+	+	+	+
DNA base composition (mol % G+C)	59-61	53-63	54-63	63-66	55-66
Major ubiquinone	Q-10	Q-9	Q-10	Q-10	Q-10

ที่มา : Yamada และคณะ, 2000 หมายถึง : w – weak

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เกศพงศ์ (2536) ได้คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแอซิดิกที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง โดยแยกเชื้อจากผลไม้ ได้แก่ ฝรั่ง องุ่น สับปะรด ชมพู อาโวคาโด และส้ม คัดเลือกได้แบคทีเรียกรดแอซิดิกทั้งหมด 27 ไอโซเลต เป็นเชื้อที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18 ไอโซเลต และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 9 ไอโซเลต แบคทีเรียกรดแอซิดิกที่คัดเลือกได้ทั้งหมดนี้จำแนกออกเป็น 2 สกุล ได้แก่ *Acetobacter* spp. 20 ไอโซเลต และ *Gluconobacter* spp. 7 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียกรดแอซิดิกที่คัดเลือกได้ไปทดลองหมักที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 32, 35 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ส่วนผสมที่เติมแอลกอฮอล์ 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรียกรดแอซิดิกผลิตกรดได้สูงที่สุดที่ 3.9-5.0 เปอร์เซ็นต์ 6 ไอโซเลตเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยแอลกอฮอล์ 4 เปอร์เซ็นต์ เชื้อสามารถผลิตกรดได้สูงสุมากกว่า 3.3 เปอร์เซ็นต์ 2 ไอโซเลต และเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยแอลกอฮอล์ 4 เปอร์เซ็นต์ เชื้อสามารถผลิตกรดได้สูงสุมากกว่า 2.3 เปอร์เซ็นต์ 2 ไอโซเลต

จุฑาทิพย์ (2538) ได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแอซิดิกโดยแยกเชื้อจากผลไม้ชนิดต่าง ๆ สภาวะที่ใช้ในการแยกเชื้อคือ แอลกอฮอล์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มี 68 ไอโซเลต และจำนวนเชื้อ ที่แยก ได้ที่อุณหภูมิ 37 มี 33 ไอโซเลต โดยใช้อาหารที่ยังมีน้ำตาลฟรุตโตสสูตรปรับปรุง 1 ที่มี brom cresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ แสดงการออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดน้ำส้มโดยเปลี่ยนสีอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และถ้าเปลี่ยนสีอาหารจากสีเหลืองมาเป็นสีม่วงจะแสดงถึงการออกซิไดซ์กรดน้ำส้มให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ ซึ่งเรียกว่า overoxidation และศึกษาความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ 30 องศาเซลเซียส เชื้อจะเจริญได้ดีมากที่สุดที่ความเข้มข้นสูงสุดของแอลกอฮอล์ 7 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 35 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อจะเจริญได้ดีมากที่สุดที่ความเข้มข้นสูงสุดของแอลกอฮอล์ 7 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 31 ไอโซเลต และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อจะเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นสูงสุดของแอลกอฮอล์ 7 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ไอโซเลต คือ B6, B7 และ LO12 ส่วนความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของกรดน้ำส้ม พบว่าที่ 30 องศาเซลเซียส เชื้อจะเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นสูงสุดของกรดน้ำส้ม 4 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อจะเจริญได้ดีที่สุดที่ความ

เข้มข้นสูงสุดของกรดน้ำส้ม 4 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 ไอโซเลตและที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อจะเจริญได้ดีมากที่สุดที่ความเข้มข้นสูงสุดของกรดน้ำส้ม 4 เปอร์เซ็นต์จำนวน 17 ไอโซเลต

เน็ทพร (2517) ได้แยกแบคทีเรียกรดแอซิติกจากอุ้งน้เขี้ยว อุ้งน้แมลง สัม น้อยหน้า สัมประรด เมาะ กล้าย ผลตาลูกกลางสาค ผรั่ง น้ำส้มสายชูที่ยังไม่ได้มาเชื้อ น้ำตาลเมา และเหล้าขาว ได้ทั้งหมด 55 เชื้อ ในจำนวนนี้สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีสมบัติที่เหมาะสมต่อการหมักน้ำส้มสายชูได้ทั้งสิ้น 5 เชื้อ คือ หมายเลข 24 แยกได้จากอุ้งน้เขี้ยว สามารถผลิตกรดได้ 4.91 เปอร์เซ็นต์ หมายเลข 35, 36 และ 42 แยกได้จากอุ้งน้แมลง ผลิตกรดได้ 6.32, 5.25 และ 4.76 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเชื้อหมายเลข 51 แยกได้จกน้เขี้ยว สามารถผลิตกรดได้ 4.70 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 5 เชื้อที่คัดเลือกได้นี้สามารถเจริญและผลิตกรดในสภาวะที่มีแอลกอฮอล์สูงถึง 12 เปอร์เซ็นต์ และสามารถทนต่อซิลิเพอร์-ไดออกไซด์ได้ถึง 100 ส่วนต่อล้านส่วน จากการศึกษาสมบัติ และจำแนกชนิดเชื้อหมายเลข 24, 36, 51 และ 52 มีสมบัติตรงกับ *Acetobacter aceti* และเชื้อหมายเลข 35 มีสมบัติตรงกับ *A. mesoxydans* สายพันธุ์ทั้ง 5 ที่คัดเลือกได้นี้ แม้ว่าเมื่อให้กรดสูงสุดแก่เพาะออกซิไดซ์กรดแล้ว แต่ก็เป็นไปอย่างช้า ๆ จึงไม่เป็นอุปสรรคต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

ประภาพรพร และวรภรณ์ (2537) ได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแอซิติกจำนวน 99 ไอโซเลต (PW 1 ถึง PW 99) จากผลไม้ต่าง ๆ จำนวน 5 ชนิด คือ กล้าย ผรั่ง มะไฟ สัมประรด และส้ม ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการแยกเชื้อคือ 30 และ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเชื้อมาทดสอบการเกิด overoxidation โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำมะพร้าวสูตรปรับปรุง 1 (เกศพงศ์, 2536) ซึ่งมี brom cresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ พบว่าจำนวน 11 ไอโซเลต สามารถทำให้เกิด overoxidation และทดสอบความสามารถในการหมักกรดน้ำส้ม และแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส โดยเปรียบเทียบสายพันธุ์มาตรฐาน คือ หมายเลข 6, 102, 104, K, ACI, IFO 3283 และ IFO 12467 ปรากฏว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญได้ดีมากที่สุดที่ความเข้มข้นกรดน้ำส้มสูงสุด 4 เปอร์เซ็นต์จำนวน 14 ไอโซเลต ส่วนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อทนความเข้มข้นของกรดน้ำส้มสูงสุดได้เพียง 3 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 4 ไอโซเลต สำหรับความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อเจริญได้ดีมากที่สุดที่ความเข้มข้นสูงสุดของแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์จำนวน 15 ไอโซเลต ส่วนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อเจริญได้ดีมากที่สุดที่ความเข้มข้นสูงสุดของแอลกอฮอล์ 7 เปอร์เซ็นต์จำนวน 5 ไอโซเลต ส่วนสายพันธุ์มาตรฐานที่นำมาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบ พบว่าสายพันธุ์หมายเลข 6, 102, 103 และ K หมักได้ดีที่สุด คือสามารถทนความเข้มข้นของกรด 4 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และสายพันธุ์ IFO 3283, IFO 12467, 6, 102, 103,

104, K และ ACI ทนความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุด 8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ที่ทนความเข้มข้นของกรดน้ำส้มได้ดีที่สุดคือ สามารถทนความเข้มข้นของกรดน้ำส้ม 3 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 5 ไอโซเลต ซึ่งได้แก่ หมายเลข 6, 102, 103, K และ ACI และสายพันธุ์ที่ทนความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุดคือสามารถทนความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ได้ 8 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 2 ไอโซเลตได้แก่ หมายเลข 6 และ K

รสสุคนธ์ (2528) แยกเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมาก สุรา ไวน์ น้ำตาลสด น้ำมะพร้าว น้ำส้มสายชู ที่ยังไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และผลไม้สุกหอม เช่น องุ่น สับปะรด ชมพู ฝรั่ง และส้ม และได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแอซิติกที่มีสมบัติต่าง ๆ เหมาะสมต่อวิธีการผลิต จากเชื้อ 310 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากตัวอย่าง 269 ตัวอย่าง และเชื้อบริสุทธิ์ 4 สายพันธุ์ (*Acetobacter aceti* 103 และ *A. aceti* 104 (นันทพร, 2517) ; *Acetobacter aceti* I และ *A. rancens* I (โรงงานน้ำส้มสายชู จังหวัดนครปฐม) พบว่ามีเพียง 10 เชื้อเท่านั้น ได้แก่ *Acetobacter aceti* 104, *A. aceti* I, *A. rancens* I, *Acetobacter* sp. 28-1, *Acetobacter* sp. 65-1, *Acetobacter* sp. 88-1, *Acetobacter* sp. 170-1, *Acetobacter* sp. 265-2, *Acetobacter* sp. 249-1, และ *A. aceti* 103 ที่ผลิตกรดได้ดีในน้ำมะพร้าวที่มีเอทานอล 8 เปอร์เซ็นต์ และจากเชื้อที่คัดเลือกได้นี้มีอยู่ 4 เชื้อ ที่ยังคงสร้างกรดได้ดีเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *A. aceti* 103, *A. aceti* I, *Acetobacter* sp. 65-1 และ *Acetobacter* sp. 170-1 เชื้อเหล่านี้ไม่ต้องการสารอาหารเพิ่ม และสามารถผลิตกรดในน้ำมะพร้าวที่เจือจางในสัดส่วนต่าง ๆ กัน เชื้อทุกสายพันธุ์ผลิตกรดได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส และพบว่ามีเชื้อที่คัดเลือกไว้ถึง 7 สายพันธุ์ สามารถผลิตกรดได้สูงกว่า 3.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งในจำนวน 6 สายพันธุ์ ยังคงผลิตกรดสูงกว่า 1.9 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งได้แก่ เชื้อ *A. aceti* 103, *A. aceti* I, *A. rancens* I, *Acetobacter* sp. 170-1, *Acetobacter* sp. 249-1 และ *Acetobacter* sp. 265-2 เชื้อเหล่านี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในเจนเนอเรเตอร์ หรือการหมักแบบ submerged โดยสามารถลดต้นทุนการผลิตในด้านการหล่อเย็น (cooling system)

Duangtip และคณะ (2000) ได้ศึกษาแบคทีเรียกรดแอซิติกที่ทนอุณหภูมิสูงในจีโนส *Gluconobacter* ที่แยกจากผลไม้ และดอกไม้ชนิดต่าง ๆ จากประเทศไทย และญี่ปุ่น โดยคัดเลือก (screen) ในอาหารที่เติมกรดกลูโคนิก และ D-sorbitol หรือ D-mannitol 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถคัดเลือกได้ *Gluconobacter* ที่ทนอุณหภูมิสูงได้ 8 สายพันธุ์คือ CMH 1, CMH 8, CMH 10, CMH 16, CMH 33, CMH 43, CMH 52 และ CMH 54 ที่สามารถผลิต D-fructose และ L-sorbose ได้ เชื้อเหล่านี้สามารถ

เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 10–30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 30–33 องศาเซลเซียส ทุกสายพันธุ์สามารถผลิต L-sorbose และ D-fructose ได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 37 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษาลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้มีความเหมือนกับ *G. frareurii* 99.36-99.79 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นทั้ง 8 สายพันธุ์จึงจัดจำแนกเป็น *G. frareurii* โดยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CMH 16 และ CMH 54 สามารถออกซิไดซ์ D-mannose และ D-sorbitol ให้เป็น D-fructose และ L-sorbose ตามลำดับ ซึ่งการออกซิไดซ์น้ำตาลแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยปราศจาก lag time ขณะที่ *G. frateurii* IFO 3246 ไม่สามารถทำได้ ประสิทธิภาพและอัตราการหมักของ CMH 16 และ CMH 54 สามารถออกซิไดซ์ D-mannose และ D-sorbitol ไปเป็น D-fructose และ L-sorbose ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีเพียง CMH 16 สายพันธุ์เดียวที่เจริญได้ดีเท่ากับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีการสะสม D-fructose ได้ 80 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

Katsura และคณะ (2001) แยกแบคทีเรียกรดแอซิดิกจากดอกไม้ในประเทศไทยและประเทศอินโดนีเซียโดยวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16SrRNA สามารถจัดจำแนกได้เป็นจีโนส *Asaia* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ G+C เท่ากับ 58.6-59.7 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์โมลต่ำกว่า *Asaia bogorensis* (59.3-61.0 เปอร์เซ็นต์ โมล) ไอโซเลตที่ได้เมื่อนำมาศึกษารูปร่างลักษณะทางสรีรวิทยา ลักษณะทางชีวเคมีพบว่า คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ *Asaia bogorensis* แต่ไม่สามารถสร้างกรดจาก ducital ได้ จึงจัดจำแนกเป็น *Asaia siamensis*. Nov ซึ่งแยกได้จากดอกกรัก (*Calotropis gigantean*)

Lu และคณะ (1999) แยกแบคทีเรียกรดแอซิดิกจากผลไม้สด ดอกไม้ ผลไม้เน่า ดิน ตะกอนไวน์ และเนื้อไม้ของไม้ผล ได้ 69 ไอโซเลต ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้จากผลไม้เน่ามากกว่าตัวอย่างอื่น ๆ และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ไปเป็นกรดแอซิดิกพบว่า ไอโซเลต I 14-2 ซึ่งแยกได้จากกล้วยเน่าในประเทศไทยได้หวันสามารถผลิตกรดน้ำส้มได้สูงสุด เมื่อนำมาจัดจำแนกเป็นเชื้อ *Acetobacter* sp. โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดน้ำส้มคือเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 2 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถผลิตกรดน้ำส้มได้เป็น 2 และ 3 เท่าของ *Acetobacter* sp. IFO 3283 และ *Acetobacter* sp. CCRC 12326 ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เป็น 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ไอโซเลต I 14-2 สามารถคงกิจกรรมในการผลิตกรดแอซิดิก (Retention activity) ได้เท่ากับ 22 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน และใน

อาหารที่มีความเข้มข้นของกรดแอซิติกเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร เชื้อยังคงกิจกรรมการผลิตกรดแอซิติกได้ 97 และ 68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 35 และ 37 องศาเซลเซียส

Ohmori และคณะ (1980) ได้ทำการแยกเชื้อจากน้ำส้ม (vinegar mash) ดินในโรงงาน น้ำส้มสายชู และผลไม้ ทำการทดสอบการออกซิไดซ์ เอทานอลที่อุณหภูมิสูงและจำแนกเชื้อ พบว่า *A. aceti* No. 1023 มีอัตราการหมักกรดน้ำส้มแบบต่อเนื่องได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ 45 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ขณะที่ *A. aceti* ทั้งหมดจะสูญเสียความสามารถในการผลิตกรดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ดังนั้นการใช้เชื้อน้ำส้มสายชูสายพันธุ์ *A. aceti* No. 1023 ช่วยลดค่าใช้จ่ายของระบบหล่อเย็นในการผลิตน้ำส้มสายชูในอุตสาหกรรมได้ สมบัติการทนอุณหภูมิสูงของ *A. aceti* No. 1023 มีความสัมพันธ์กับการทนต่อกรดน้ำส้ม เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีเอทานอล พบว่าเซลล์สูญเสียความสามารถในการทนกรดน้ำส้มในอัตราสูง (มากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ ในสายพันธุ์ที่แยกได้) และสูญเสียความสามารถในการออกซิไดซ์เอทานอลในอัตราที่ต่ำ (ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์) ใน stationary growth phase และพบว่าเซลล์ที่สูญเสียสมบัติเหล่านี้โอกาสจะกลับมามีสมบัติดั้งเดิมน้อยกว่า $1/10^9$ เซลล์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าการสูญเสียความสามารถในการทนกรดน้ำส้ม และการออกซิไดซ์เอทานอลเป็นสาเหตุมาจากพลาสมิดดีเอ็นเอ หรือสารพันธุกรรมบางอย่างขาดหายไป (Ohmori และคณะ, 1982)

Ohmori และคณะ (1982) ได้ศึกษาความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงของแบคทีเรียกรดแอซิติก *Acetobacter aceti* No. 1023 พบว่ามีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทนกรดแอซิติก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเอทานอล พบว่าเซลล์สูญเสียความสามารถในการทนกรดแอซิติกในความเข้มข้นสูงมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ และสูญเสียความสามารถในการออกซิไดซ์เอทานอลประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ใน stationary growth phase ซึ่งถือว่าเป็นอัตราที่ต่ำ และพบว่าเซลล์ที่สูญเสียคุณสมบัติเหล่านี้จะมีโอกาสกลับมามีคุณสมบัติดั้งเดิมน้อยกว่า $1/10^9$ เซลล์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าการสูญเสียความสามารถในการทนกรดแอซิติก และการออกซิไดซ์เอทานอลเป็นสาเหตุมาจากพลาสมิดดีเอ็นเอ หรือการขาดหายไปของสารพันธุกรรม

Saeki และคณะ (1997) ศึกษาแบคทีเรียกรดแอซิติกที่ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant strains) ซึ่งแยกได้ในประเทศไทย พบว่าเชื้อเหล่านี้สามารถผลิตกรดน้ำส้มได้สูงที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส และเมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม 4 เปอร์เซ็นต์ เชื้อยังคงออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดน้ำส้ม ขณะที่สายพันธุ์ mesophilic (สายพันธุ์ IFO) สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรด น้ำส้มที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ได้เฉพาะสภาวะที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม 2 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้เชื้อน้ำส้มสายชูสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงสามารถออกซิไดซ์เอทานอลที่มีความเข้มข้น 9 เปอร์เซ็นต์ โดยปราศจาก lag time ขณะที่สายพันธุ์ mesophilic สามารถออกซิไดซ์ได้ล่าช้า หรือเกือบจะไม่ออกซิไดซ์เอทานอลได้เลยในสภาวะนี้สำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส ด้วยสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงจะทำงานได้รวดเร็วด้วยอัตราการหมักที่สูงกว่าขณะที่สายพันธุ์ mesophilic ไม่สามารถทำได้ ส่วนการหมักน้ำส้มสายชูแบบ submerged culture ที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ประสบผลสำเร็จเช่นเดียวกับการหมักน้ำส้มสายชูแบบ static culture และการหมักน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส โดยใช้สายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงมีอัตราการหมัก และประสิทธิภาพการหมักสูงกว่าใช้สายพันธุ์ mesophilic ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 2-3 เท่า ดังนั้นการใช้แบคทีเรียกรดแอซิติกสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงในการหมักน้ำส้มสายชูที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส จึงมีประโยชน์ในการช่วยลดค่าใช้จ่ายในระบบหล่อเย็น

ต่อมา Saeiki และคณะ (1997) ศึกษาการเกิด acetate oxidation ในแบคทีเรียกรดแอซิติกจีโนส *Acetobacter* พบว่าเมื่อแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในอาหารถูกใช้หมดเหลือเพียงกรดน้ำส้มใน late stationary phase เชื้อจะเริ่มใช้กรดน้ำส้มที่สะสมในอาหาร และเจริญอย่างรวดเร็วเกิด stationary phase ที่สองได้ biphasic growth ซึ่งเซลล์จาก growth phase แรกจะทนต่อกรดน้ำส้ม ขณะที่เซลล์จาก growth phase ที่สองไม่ทนต่อกรดน้ำส้ม อย่างไรก็ตาม acetate oxidation จะไม่เกิดขึ้นเมื่อเอทานอลยังสามารถถูกออกซิไดซ์ และมีแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และใน vinegar mash มีกรดน้ำส้มสะสมมากกว่า 4.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าความเข้มข้นสุดท้ายของกรดน้ำส้มสะสมน้อยกว่า 3.7 เปอร์เซ็นต์เชื้อจะเกิดการออกซิไดซ์แอซิเตท เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแต่กรดน้ำส้มเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานจะเกิดช่วง lag time ยาว เชื้อจะใช้กรดน้ำส้มหลัง lag time และ lag time ถูกทำให้สั้นลงได้โดยเติมแหล่งพลังงานเพียงเล็กน้อยเช่นเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อจากการ วิเคราะห์เอนไซม์ในการสังเคราะห์ acetyl-CoA จากแอซิเตท พบกิจกรรมของเอนไซม์ acetyl-CoA synthetase สูงขึ้น ขณะที่เอนไซม์ acetate kinase และ phosphotransacetylase ไม่เปลี่ยนแปลง และเมื่อ acetate ถูกใช้กิจกรรมของเอนไซม์ isocitrate lyase และ malate synthase ในเซลล์สูงขึ้นเช่นกัน ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากรดน้ำส้มถูกเปลี่ยนไปเป็น acetyl-CoA โดยเอนไซม์ acetyl-CoA synthetase เพื่อนำแอซิเตทเข้าสู่วัฏจักร Tricarboxylic acid เช่นเดียวกับวัฏจักร Glyoxylate ซึ่งเชื้อเจริญอย่างรวดเร็วบนกรดน้ำส้มหลังจากเอทานอลในอาหารถูกใช้หมด ผลการศึกษาการเจริญและข้อมูลด้านเอนไซม์ แสดงว่าเซลล์จาก growth phase แรกมีลักษณะทางสรีรวิทยาแตกต่างจาก growth phase ที่สอง

Schüller และคณะ (2000) แยกแบคทีเรียกรดแอซิดิกจากการหมักน้ำส้มสายชูที่มีความเข้มข้นของกรดสูงจากทางตอนใต้ของประเทศเยอรมัน ได้ 4 สายพันธุ์ คือ LTH 4560T^T, LTH 4341, LTH 4551 และ LTH 4637 เมื่อนำมาศึกษาความต้องการกรดแอซิดิก เอทานอล และกลูโคสในการเจริญ การเกิด overoxidation ของแอซิดิก ความสามารถเจริญในความเข้มข้นรวมของกรดแอซิดิก และแอลกอฮอล์ 6 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษา 16S rRNA พบว่าสายพันธุ์ LTH 4560 มีความคล้ายคลึงกับ *Gluconacetobacter hansenii* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำมาศึกษา DNA-DNA similarity พบว่ามีความคล้ายคลึงกันต่ำ (<41%) ศึกษาทางด้านสรีรวิทยา พบว่ามีความแตกต่างกันชัดเจน และพบ IS 1031C ใน 4 สายพันธุ์ที่เหมือนกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า *Gluconacetobacter entanii* เป็นสปีชีส์ใหม่ โดยเซลล์รูปร่างรูปไข่ ถึงเป็นท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อย ขนาด 0.8-1.1 x 1.3-1.6 ไมโครเมตร ไม่เคลื่อนที่ ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นสาย และส่วนใหญ่เป็นคู่ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ดิจีสเทอเรสลบ เมแทบอลิซึมเป็นแบบการหายใจ ไม่มีรูปแบบการหมัก เมื่อเจริญบนอาหาร AE ลักษณะโคโลนีกลมมนซ้อนกัน เป็นมันวาว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร สร้างเอนไซม์แคตะเลส ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส เจริญในอาหารที่มีกรดแอซิดิก เอทานอล และกลูโคส เจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นรวมของกรดแอซิดิก และแอลกอฮอล์ มากกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ ออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดแอซิดิก ไม่เกิด overoxidation เจริญบนอาหารที่มีเอทานอล 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) และแอซิดิกมากกว่า 11 เปอร์เซ็นต์ ไม่ใช้กลูโคเนท กลีเซอรอล และแลคเตท ไม่สร้างกรด ketogluconic จากกลูโคส เจริญได้ดีบนอาหารเหลว AE ที่มีกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส โมลเปอร์เซ็นต์ G+C เท่ากับ 58

Yamada และคณะ (2000) ได้ทำการแยกและจำแนกแบคทีเรียกรดแอซิดิกจากดอกกล้วยไม้ (*Bauhinia purpuria*) ดอกเจตมูลเพลิง (*Plumbago auriculata*) เมื่อศึกษา 16S rRNA gene sequence จัดจำแนกเป็น *Asaia bogorensis* sp. nov. พบว่าดิจีสเทอเรสลบ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ รูปร่างเป็นท่อน ขนาดเซลล์ 0.4-1.0 x 0.8-2.0 ไมโครเมตร โคโลนีเมื่อเลี้ยงบนอาหาร AG มีสีชมพูขาวอมเหลืองค่อนข้างหนาสูง ผิวเรียบเป็นมันวาว ขอบเรียบ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 3-30 องศาเซลเซียส ไม่สร้างสารสีน้ำตาลที่ละลายน้ำได้ ผลิต dihydroxyacetone จาก glycerol ได้เล็กน้อย ความหนืดขึ้นกับสายพันธุ์ ผลิตกรดจาก D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-fructose, L-sorbose, D-xylose, ribitol, meso-erythritol, glycerol และ melibiose แต่ไม่สร้างจาก lactose ผลิตกรดจาก D-mannitol และ D-sorbitol ได้แตกต่างกันตามสายพันธุ์ quinone เป็น Q-10 โมลเปอร์เซ็นต์ G+C เท่ากับ 60.2

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การแยกเชื้อจากธรรมชาติ

วัสดุจากธรรมชาติที่นำมาแยกเชื้อ ได้แก่ ผลไม้ และ ดอกไม้

1.1 นำผลไม้สุกงอม และ ดอกไม้ ที่เริ่มเกิดการหมักแต่ละชนิดมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 5 กรัม ใส่ลงในขวดปากกว้างที่มีอาหาร Seed culture 20 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับแล้วปิดด้วยผ้าขาวบาง

1.2 นำขวดตัวอย่างทุก ๆ ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์มาบ่ม โดยแต่ละความเข้มข้นบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-5 วัน

1.3 สังเกตภายในขวดจะมีเมือกเกิดขึ้นที่ผิวหน้าตัวอย่าง ใช้ลูปป้ายเชื้อแต่ละเมือก และปลูกเชื้อลงบนอาหาร Potato medium ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) และแอลกอฮอล์ 2 เปอร์เซ็นต์ ทุก 1, 3 และ 5 วัน

1.4 คัดเลือกโคโลนีที่รอบ ๆ เกิดโซนใส (clear zone)

1.5 นำเชื้อบริสุทธิ์จากข้อ 1.4 มาย้อมสีแกรมและทดสอบแคตาเลส (catalase test) เพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียกรดแอสิดิกหรือไม่

2. ศึกษาสมบัติในการทนกรดและแอลกอฮอล์

2.1 ทดสอบการทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดแอสิดิกที่อุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 42 องศาเซลเซียส

streak เชื้อลงบนอาหาร potato medium ที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 1 เปอร์เซ็นต์ และกรดน้ำส้ม 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 42 องศาเซลเซียส

2.2 ทดสอบการทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 42 องศาเซลเซียส

streak เชื้อลงบนอาหาร potato medium ที่มีความเข้มข้นของกรดแอสิดิก

1 เปอร์เซ็นต์ และแอลกอฮอล์ 1 และ 8 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 42 องศาเซลเซียส

3. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแอซิดิก

3.1 การจำแนกเชื้อกรดแอซิดิกระดับจีโนส

ปลูกเชื้อลงบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วย difco yeast extract 3 เปอร์เซ็นต์ bromocresol green (สารละลาย 2.2 เปอร์เซ็นต์ ในเอทานอล 1.0 มิลลิตรต่อลิตร) และ แอลกอฮอล์ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2–14 วัน เพื่อตรวจสอบการเกิด overoxidation ถ้าอาหารเปลี่ยนเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสีเหลืองและเปลี่ยนกลับจากสีเหลืองเป็นสีเขียวแกมน้ำเงินอีกครั้ง แสดงว่าเกิด overoxidation ให้ผลบวก เชื้อจัดอยู่ในจีโนส *Acetobacter* ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสีเหลือง ให้ผลลบแสดงว่าเชื้อจัดอยู่ในจีโนส *Gluconobacter*

3.2 การจำแนกเชื้อกรดแอซิดิกระดับสปีชีส์

3.2.1 แคตาเลส (catalase)

ปลูกเชื้อลงในอาหารแข็ง potato medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไป 1 มิลลิตรให้ทั่วเชื้อ ถ้าเกิดฟองแก๊สแสดงว่าแบคทีเรียมีเอนไซม์แคตาเลส ให้ผลบวก ไม่เกิดฟองให้ผลลบ

3.2.2 การเกิดคีโตนจากกลีเซอรอล (ketogenesis in glycerol)

ปลูกเชื้อบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วย yeast extract 3 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หยดสารละลาย Fehling ลงบนอาหารที่ปลูกเชื้อ ทิ้งไว้ระยะหนึ่ง ถ้าเกิดวงสีส้มของ cuprous oxide ให้ผลบวก และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงให้ผลลบ

3.2.3 การสร้างกลูโคนัท (formation of gluconate)

ปลูกเชื้อบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วย yeast extract 3 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) โดยเกลี่ยเชื้อให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบบริเวณใสรอบโคโลนีที่เชื้อเจริญ ถ้าเกิดบริเวณใสให้ผลบวก และไม่เกิดให้ผลลบ

3.2.4 การเจริญในอาหารที่มีเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน

ปลูกเชื้อลงในอาหารแข็ง Hoyer – Frateur (ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญของเชื้อ ถ้าเชื้อเจริญให้ผลบวก ถ้าไม่เจริญให้ผลลบ

3.2.5 การสร้างเซลลูโลส (production of cellulose)

ปลูกเชื้อในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย น้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตร กรดน้ำส้ม (CH_3COOH) 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลทราย 5 เปอร์เซ็นต์ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) ปิดด้วยผ้าขาวบาง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ดูการสร้างเซลลูโลสบนผิวอาหารเหลวให้ผลบวกและไม่สร้างเซลลูโลสให้ผลลบ

3.2.6 การสร้างสีน้ำตาล (Formation of water – soluble brown pigment on GYC medium)

ปลูกเชื้อลงบนอาหารแข็ง GYC (ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลโดยเชื้อจะทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ให้ผลบวกและไม่เกิดสีน้ำตาลให้ผลลบ

3.2.7 การสร้างไฮโดเจนซัลไฟด์ (Formation of H_2S)

ฉีดเชื้อลงบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) TSI (ภาคผนวก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลโดยเชื้อจะเปลี่ยนอาหารเป็นสีดำให้ผลบวก ถ้าไม่เกิดสีดำให้ผลลบ)

3.2.8 การสร้าง γ -Pyrone จาก D – glucose และ D – fructose

ปลูกเชื้อลงในหลอดอาหารเหลวที่ประกอบด้วย yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ CaCO_3 3 เปอร์เซ็นต์ และ D – glucose หรือ D – fructose 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง เป็นเวลา 11 วัน จากนั้นจึงเติม FeCl_3 (5% w/v) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ตรวจสอบผลโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีน้ำตาล ถ้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลให้ผลบวก ถ้าไม่เปลี่ยนให้ผลลบ

3.2.9 การเจริญในเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์

(growth in the presence of 10% ethanol)

ปลูกเชื้อลงบนอาหารแข็ง ที่ประกอบด้วย glucose 1.5 เปอร์เซ็นต์ yeast extract 0.2 เปอร์เซ็นต์ peptone 0.3 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ถ้าเชื้อเจริญให้ผลบวก ถ้าไม่เจริญให้ผลลบ

3.2.10 การเจริญบนอาหารแข็ง MGYP

(Mannitol Glucose Yeast extract Peptone)

ปลูกเชื้อลงบนอาหารแข็ง MGYP (ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลโดยการเจริญของเชื้อ ถ้าเชื้อเจริญให้ผลบวก เชื้อไม่เจริญให้ผลลบ

3.2.11 การเจริญบน D-glucose 30 เปอร์เซ็นต์

(growth on 30% D - glucose)

ปลูกเชื้อลงในอาหารที่ประกอบด้วย yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ polypeptone 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose 30 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลโดยการเจริญของเชื้อ ถ้าเชื้อเจริญให้ผลบวก เชื้อไม่เจริญให้ผลลบ

3.2.12 Assimilation of ammonical nitrogen

ปลูกเชื้อลงในอาหารแข็งที่ประกอบด้วย D-glucose 5 เปอร์เซ็นต์ ammonium sulfate 0.3 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.3 เปอร์เซ็นต์ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลโดยการเจริญของเชื้อ ถ้าเชื้อเจริญให้ผลบวก ถ้าไม่เจริญให้ผลลบ

3.2.13 การเจริญในเมทานอล (growth in Methanol)

จัดเชื้อลงในอาหารแข็งที่ประกอบด้วยเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลโดยการเจริญของเชื้อ ถ้าเชื้อเจริญให้ผลบวก เชื้อไม่เจริญให้ผลลบ

4. ศึกษาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสและอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสจาก membrane fraction ของแบคทีเรียกรดแอซิติกที่ทนกรด แอลกอฮอล์และอุณหภูมิสูง

4.1 เลี้ยงเชื้อในอาหาร seed culture ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื่อนาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.2 นำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นและนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 rpm อีกครั้ง

4.3 suspension เซลล์ ด้วยสารละลาย KPB pH 6.0 ความเข้มข้น 10 mM จากนั้นนำไป french press จำนวน 2 ครั้งและนำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

- 4.4 นำส่วนใสที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 40,000 rpm เป็นเวลาชั่วโมง ทิ้งส่วนใสและนำเซลล์ที่ได้ไป homogenise ด้วยสารละลาย KPB pH6.0 ความเข้มข้น 10 mM
- 4.5 นำ membrane fraction ที่ได้ไปหากิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสและอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส

บทที่ 4

ผลการดำเนินงาน

4.1 การแยกเชื้อจากธรรมชาติ

จากการนำผลไม้สุกงอมและดอกไม้มาแยกเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร seed culture ที่มีแอลกอฮอล์ 1,2,3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สามารถแยกแบคทีเรียกรดแอซิดิกได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลต โดยแยกจากดอกไม้ 34 ไอโซเลตและผลไม้ 36 ไอโซเลตและเมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้มาขย้อมสีแกรมและทดสอบแคตาเลส พบว่าทุกไอโซเลตติดสีแกรมลบ รูปร่างลักษณะเป็นท่อนสั้น และให้ผลแคตาเลสเป็นบวก ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การแยกเชื้อและลักษณะของแบคทีเรียกรดแอซิดิก

ไอโซเลต	วัสดุที่ใช้แยก	รูปร่าง	ติดสีแกรม	แคตาเลส
FI 1	ดอกเพชรสังฆาต	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 2	ดอกแค	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 3	ดอกแพงพวย	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 4	ดอกมะลิ	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 5	ดอกส้มโมง	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 6	ดอกขลุ่ย	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 7	ดอกอังกาบ	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 8	ดอกพิкуль	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 9	ดอกลำโพง	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 10	ดอกเสลดพังพอน	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 11	ดอกบัว	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 12	ดอกเพกา	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 13	ดอกกระทือ	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 14	ดอกเข็มเหลือง	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 15	ดอกพุดตาน	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 16	ดอกเกี้ยวเกล้า	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 17	ดอกประดักจีน	ท่อนสั้น	ลบ	บวก

ตารางที่ 3 (ต่อ) การแยกเชื้อและลักษณะของแบคทีเรียกรดแอซิดิก

ไอโซเลต	วัสดุที่ใช้แยก	รูปร่าง	ติดสีแกรม	แคตาเลส
FI 18	ดอกฟักทอง	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 19	ดอกช่อนกลั่น	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 20	ดอกช่อนกลั่น	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 21	ดอกช่อนกลั่น	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 22	ดอกช่อนกลั่น	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 23	ดอกปีป	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 24	ดอกขจร	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 25	ดอกขจร	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 26	ดอกขจร	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 27	ดอกพลับพลึง	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 28	ดอกบานบุรีเหลือง	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 29	ดอกลิ้นทมแดง	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 30	ดอกลิ้นทมแดง	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 31	ดอกคำแสด	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 32	ดอกคำแสด	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 33	ดอกบานชื่น	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
FI 34	ดอกอัญชัญ	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 35	ลูกค้อ	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 36	ลูกค้อ	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 37	ลูกค้อ	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 38	ตะโก	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 39	ตะโก	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 40	ตะขบฝรั่ง	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 41	ลูกจันทร์	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 42	ลำไย	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 43	ลำไย	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 44	ขนุน	ท่อนสั้น	ลบ	บวก

ตารางที่ 3 (ต่อ) การแยกเชื้อและลักษณะของแบคทีเรียกรดแอซิดิก

ไอโซเลต	วัสดุที่ใช้แยก	รูปร่าง	ติดสีแกรม	แคตาเลส
Fr 45	มะม่วง	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 46	ลิ้นจี่	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 47	ลิ้นจี่	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 48	ลิ้นจี่	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 49	เชอร์รี่	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 50	มะละกอ	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 51	ส้มโอ	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 52	ส้มโอ	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 53	ชมพู	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 54	ชมพู	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 55	ชมพู	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 56	เสาวรส	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 57	เสาวรส	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 58	สับปะรด	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 59	สับปะรด	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 60	สับปะรด	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 61	องุ่น	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 62	องุ่น	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 63	องุ่น	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 64	กล้วยน้ำว้า	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 65	กล้วยน้ำว้า	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 66	กล้วยน้ำว้า	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 67	พุทรา	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 68	พุทรา	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 69	พุทรา	ท่อนสั้น	ลบ	บวก
Fr 70	พุทรา	ท่อนสั้น	ลบ	บวก

4.2 ศึกษาสมบัติในการทนกรดและแอลกอฮอล์

การทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดแอซิดิกที่อุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 42 องศาเซลเซียส โดยนำแบคทีเรียกรดแอซิดิกจำนวน 70 ไอโซเลตที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร seed culture ที่มีกรดแอซิดิก 1, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 42 องศาเซลเซียสพบจำนวน 21 ไอโซเลตสามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้แก่ FI 1, FI 5, FI 6, FI 7, FI 8, FI 10, FI 12, FI 13, FI 16, FI 22, Fr 35, Fr 36, Fr 42, Fr 49, Fr 50, Fr 52, Fr 55, Fr 57, Fr 59, Fr 65 และ Fr 67 จำนวน 6 ไอโซเลตสามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้แก่ FI 8, FI 27, FI 34, Fr 37, Fr 38 และ Fr 40 จำนวน 18 ไอโซเลต สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้แก่ FI 2, FI 9, FI 19, FI 20, FI 21, FI 23, FI 25, FI 26, FI 29, FI 33, Fr 41, Fr 44, Fr 48, Fr 58, Fr 62, Fr 64, Fr 66 และ Fr 69 จำนวน 4 ไอโซเลต สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้แก่ Fr 45, Fr 46, Fr 47 และ Fr 68 จำนวน 2 ไอโซเลต สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ได้แก่ FI 24 และ Fr 63 จำนวน 1 ไอโซเลต สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ได้แก่ Fr 56 และไม่เจริญบนอาหารที่มีกรดแอซิดิกจำนวน 18 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4

การทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 42 องศาเซลเซียส จากการนำแบคทีเรียกรดแอซิดิกจำนวน 70 ไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดแอซิดิก 1 เปอร์เซ็นต์และแอลกอฮอล์ 8-12 เปอร์เซ็นต์ พบแบคทีเรียกรดแอซิดิกจำนวน 9 ไอโซเลตสามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้แก่ FI 2, FI 9, FI 12, FI 13, Fr 44, Fr 51, Fr 55, Fr 62 และ Fr 64 จำนวน 30 ไอโซเลตสามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้แก่ FI 7, FI 19, FI 20, FI 21, FI 24, FI 25, FI 26, FI 29, FI 33, FI 34, Fr 35, Fr 36, Fr 37, Fr 38, Fr 39, Fr 41, Fr 42, Fr 45, Fr 46, Fr 47, Fr 48, Fr 56, Fr 57, Fr 58, Fr 63, Fr 65, Fr 66, Fr 67, Fr 68 และ Fr 69 และไม่เจริญบนอาหารที่มีแอลกอฮอล์ 8-12 เปอร์เซ็นต์จำนวน 31 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นกรดแอสซิดิกและแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 30,37,40 และ42องศาเซลเซียส

ไอโซเลต	วัสดุที่ใช้แยก	การทนกรดแอสซิดิก (%)				การทนแอลกอฮอล์ (%)			
		30C°	37 C°	40 C°	42 C°	30C°	37 C°	40 C°	42 C°
F1 1	ดอกเพชรสังฆาต	1	-	-	-	-	-	-	-
F1 2	ดอกแค	2	2	-	-	8	-	-	-
F1 3	ดอกแพงพวย	-	-	-	-	-	-	-	-
F1 4	ดอกมะลิ	-	-	-	-	-	-	-	-
F1 5	ดอกส้มโม่ง	1	-	-	-	-	-	-	-
F1 6	ดอกขลุ่ย	1	-	-	-	-	-	-	-
F1 7	ดอกอังกาบ	1	-	-	-	10	8	-	-
F1 8	ดอกพิกุล	1	-	-	-	-	-	-	-
F1 9	ดอกลำโพง	2	2	-	-	8	-	-	-
F1 10	ดอกเสลดพังพอน	1	-	-	-	-	-	-	-
F1 11	ดอกบัว	1	-	-	-	-	-	-	-
F1 12	ดอกเพกา	1	-	-	-	8	-	-	-
F1 13	ดอกกระทือ	1	-	-	-	8	-	-	-
F1 14	ดอกเข็มเหลือง	-	-	-	-	-	-	-	-
F1 15	ดอกพุดตาน	-	-	-	-	-	-	-	-
F1 16	ดอกเกี้ยวเกล้า	1	-	-	-	-	-	-	-
F1 17	ดอกประทัดจีน	-	-	-	-	-	-	-	-
F1 18	ดอกฟักทอง	2	1	-	-	-	-	-	-
F1 19	ดอกช่อนกลื่น	2	2	-	-	12	8	-	-
F1 20	ดอกช่อนกลื่น	2	2	-	-	12	8	-	-
F1 21	ดอกช่อนกลื่น	2	2	-	-	11	8	-	-
F1 22	ดอกช่อนกลื่น	1	-	-	-	-	-	-	-
F1 23	ดอกปีป	2	2	-	-	-	-	-	-
F1 24	ดอกขจร	2	2	2	1	12	8	-	-
F1 25	ดอกขจร	2	2	-	-	12	8	-	-

ตารางที่ 4 (ต่อ) การทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นกรดแอซิดิกและแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 30,37,40 และ 42 องศาเซลเซียส

ไอโซเลต	วัสดุที่ใช้แยก	การทนกรดแอซิดิก (%)				การทนแอลกอฮอล์ (%)			
		30C°	37 C°	40 C°	42 C°	30C°	37 C°	40 C°	42 C°
Fl 26	ดอกขจร	2	2	-	-	12	8	-	-
Fl 27	ดอกพลับพลึง	1	1	-	-	-	-	-	-
Fl 28	ดอกบานบุรีเหลือง	-	-	-	-	-	-	-	-
Fl 29	ดอกลั่นทมแดง	2	2	-	-	12	8	-	-
Fl 30	ดอกลั่นทมแดง	-	-	-	-	-	-	-	-
Fl 31	ดอกคำแสน	-	-	-	-	-	-	-	-
Fl 32	ดอกคำแสน	-	-	-	-	-	-	-	-
Fl 33	ดอกบานชื่น	2	2	-	-	11	8	-	-
Fl 34	ดอกอัญชัญ	1	1	-	-	9	8	-	-
Fr 35	ลูกค้อ	1	-	-	-	12	8	-	-
Fr 36	ลูกค้อ	1	-	-	-	12	8	-	-
Fr 37	ลูกค้อ	1	1	-	-	12	8	-	-
Fr 38	ตะโก	2	1	-	-	10	8	-	-
Fr 39	ตะโก	2	-	-	-	12	8	-	-
Fr 40	ตะขบฝรั่ง	1	1	-	-	-	-	-	-
Fr 41	ลูกจันทร์	2	2	-	-	12	8	-	-
Fr 42	ลำไย	1	-	-	-	10	8	-	-
Fr 43	ลำไย	-	-	-	-	-	-	-	-
Fr 44	ขนุน	2	2	-	-	8	-	-	-
Fr 45	มะม่วง	2.5	2	1	-	10	8	-	-
Fr 46	ลิ้นจี่	2.5	2.5	1	-	10	8	-	-
Fr 47	ลิ้นจี่	2	2	1	-	11	8	-	-
Fr 48	ลิ้นจี่	2	2	-	-	11	8	-	-
Fr 49	เชอร์รี่	1	-	-	-	-	-	-	-
Fr 50	มะละกอ	1	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4 (ต่อ) การทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นกรดแอซิดิกและแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 30,37,40 และ 42 องศาเซลเซียส

ไอโซเลต	วัสดุที่ใช้แยก	การทนกรดแอซิดิก (%)				การทนแอลกอฮอล์ (%)			
		30C°	37 C°	40 C°	42 C°	30C°	37 C°	40 C°	42 C°
Fr 51	ส้มโอ	-	-	-	-	8	-	-	-
Fr 52	ส้มโอ	-	-	-	-	8	-	-	-
Fr 53	ชมพู	-	-	-	-	-	-	-	-
Fr 54	ชมพู	-	-	-	-	-	-	-	-
Fr 55	ชมพู	1	-	-	-	8	-	-	-
Fr 56	เสาวรส	2.5	2.5	2.5	2	12	8	-	-
Fr 57	เสาวรส	1	-	-	-	12	8	-	-
Fr 58	สับปะรด	2	2	-	-	12	8	-	-
Fr 59	สับปะรด	1	-	-	-	-	-	-	-
Fr 60	สับปะรด	-	-	-	-	-	-	-	-
Fr 61	องุ่น	-	-	-	-	-	-	-	-
Fr 62	องุ่น	2	2	-	-	8	-	-	-
Fr 63	องุ่น	2.5	2.5	2	1	11	8	-	-
Fr 64	กล้วยน้ำว้า	2	2	-	-	8	-	-	-
Fr 65	กล้วยน้ำว้า	1	-	-	-	11	8	-	-
Fr 66	กล้วยน้ำว้า	2	2	-	-	12	8	-	-
Fr 67	พุทรา	1	-	-	-	10	8	-	-
Fr 68	พุทรา	2	2	1	-	12	8	-	-
Fr 69	พุทรา	2.5	2	-	-	12	8	-	-
Fr 70	พุทรา	-	-	-	-	-	-	-	-

4.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแอซิดิกที่ทนกรด แอลกอฮอล์และทนอุณหภูมิสูง

จากการนำแบคทีเรียกรดแอซิดิกที่ทนกรดแอซิดิกได้สูงสุด 1-2 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสและแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจำนวน 3 ไอโซเลตได้แก่ ไอโซเลต FI24, Fr56 และ FR63 มาศึกษารูปร่าง ลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม และทดสอบสมบัติทางชีวเคมีโดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานคือ *A. aceti* IFO3283, *A. pasteurianus* TISTR1056^T และ *A. liquefaciens* TISTR1057^T พบว่าไอโซเลต FI24 และ FR63 เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ ลักษณะโคโลนีสีครีมกลมนูน ขอบเรียบ เกิด overoxidation สร้างเอนไซม์แคตาเลส ไม่สร้างสีนํ้าตาลบนอาหาร GYP ไม่สร้าง γ -pyrone จาก D-glucose และ D-fructose สร้าง gluconate เกิดคีโตนจากกลีเซอรอล ไม่เจริญบน Hoyer-Frateur เจริญบน MGYT ไม่เจริญบนเมทานอล ไม่เจริญบนเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่เจริญบนกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์ ไม่ใช้แอมโมเนีย ไม่สร้างเซลลูโลส และไม่สร้าง H_2S จัดจำแนกเป็น *Acetobacter aceti* และไอโซเลต Fr56 เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ ลักษณะโคโลนีสีครีมกลมนูน ขอบเรียบ เกิด overoxidation สร้างเอนไซม์แคตาเลส ไม่สร้างสีนํ้าตาลบนอาหาร GYP ไม่สร้าง γ -pyrone จาก D-glucose และ D-fructose ไม่สร้าง gluconate เกิดคีโตนจากกลีเซอรอล ไม่เจริญบน Hoyer-Frateur เจริญบน MGYT ไม่เจริญบนเมทานอล ไม่เจริญบนเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ เจริญบนกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์ ไม่ใช้แอมโมเนีย ไม่สร้างเซลลูโลส และไม่สร้าง H_2S จัดจำแนกเป็น *Acetobacter pasteurianus* ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรียกรดแอซิติกที่ทนกรด
แอลกอฮอล์ และทนอุณหภูมิสูง

ลักษณะที่ใช้ในการจำแนก	ไอโซเลต					
	FI24	Fr56	Fr63	<i>A. aceti</i>	<i>A.pasteurianus</i>	<i>A. liquefaciens</i>
				IFO3284	TISTR 1056T	TISTR 1057T*
การติดสีแกรม	-	-	-	-	-	-
รูปร่างของเซลล์	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น
ลักษณะโคโลนี	สีครีม	สีครีม	สีครีม	สีครีม	สีครีม	สีครีม
	กลมมน	กลมมน	กลมมน	กลมมน	กลมมน	กลมมน
	ขอบเรียบ	ขอบเรียบ	ขอบเรียบ	ขอบเรียบ	ขอบเรียบ	ขอบเรียบ
การเกิด overoxidation	+	+	+	+	+	+
การสร้างเอนไซม์ catalase	+	+	+	+	+	+
การสร้างสื่อน้ำตาลบนอาหาร	-	-	-	-	-	+
GYP						
γ-pyrone from D-glucose	-	-	-	-	-	+
γ-pyrone from D-fructose	-	-	-	-	-	+
การสร้าง gluconate	+	-	+	+	-	+
การเกิดคีโตนจากกลีเซอรอล	+	-	+	+	-	+
การเจริญบน Hoyer-Frateur	-	-	-	-	-	+
การเจริญบน MGYP	+	+	+	+	+	+
การเจริญบนเมทานอล	-	-	-	-	-	-
การเจริญบน 10% ethanol	-	-	-	-	-	-
การเจริญบน 30% D-glucose	-	+	-	+	+	-
การใช้แอมโมเนีย	-	-	-	-	-	-
การสร้างเซลล์ไลส	-	-	-	-	-	-
การสร้าง H2S	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : - : negative, + : positive, และ *แบคทีเรียชนิดนี้ปัจจุบันจำแนกเป็น

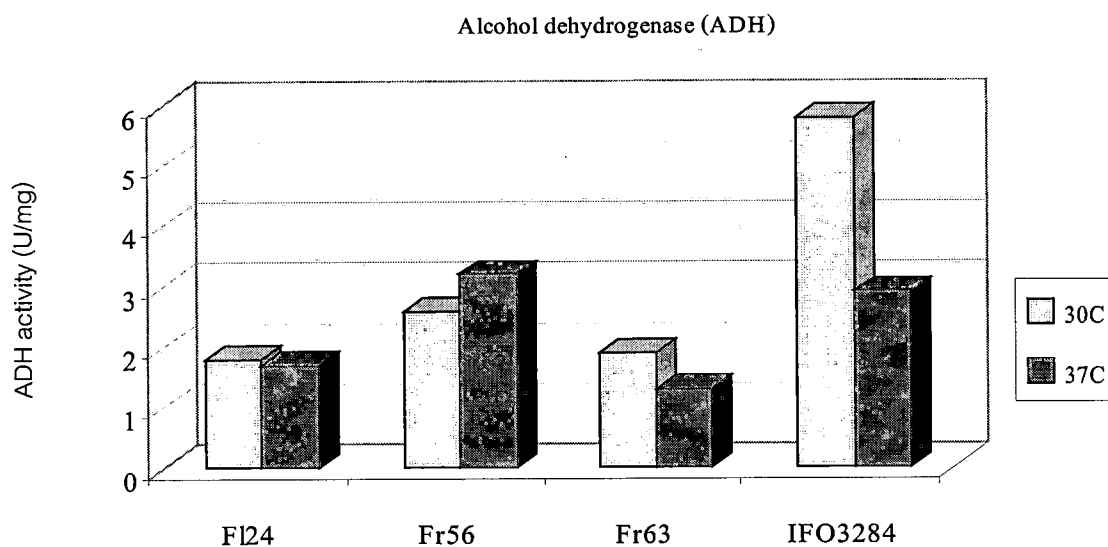
Gluconacetobacter liquefaciens

4.4 ศึกษาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (ADH) และอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (ALDH) จาก membrane fraction ของแบคทีเรียกรดแอซิดิกที่ทนกรดแอซิดิก แอลกอฮอล์และอุณหภูมิสูง

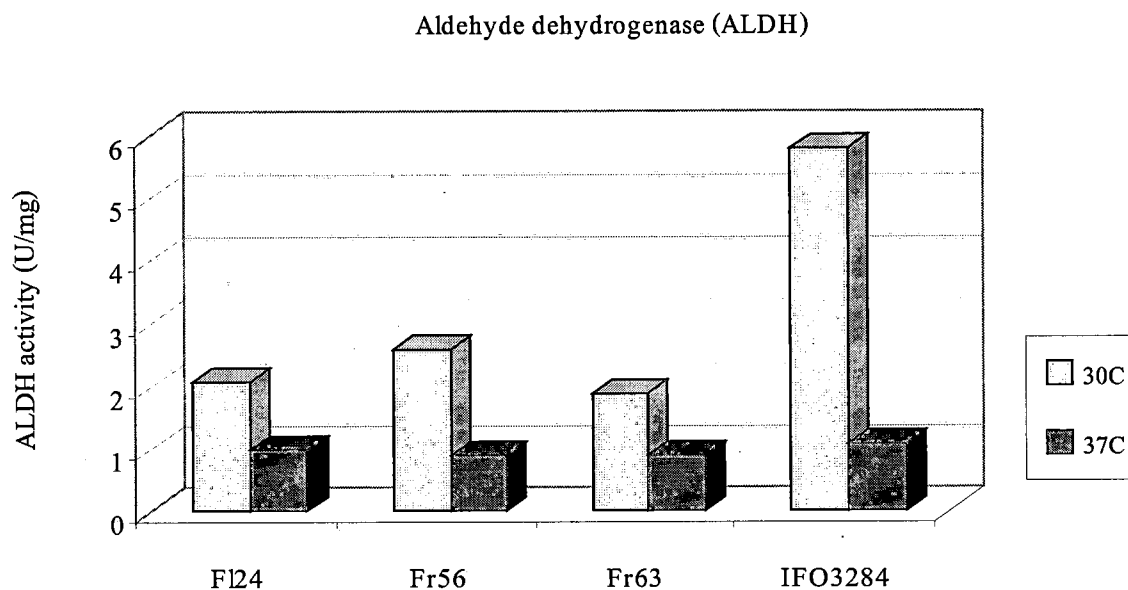
นำแบคทีเรียกรดแอซิดิกจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Acetobacter aceti* FI 24 ซึ่งมีสมบัติทนกรดแอซิดิก 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และทนแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *Acetobacter pasteurianus* Fr 56 ซึ่งมีสมบัติทนกรดแอซิดิก 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และทนแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ *Acetobacter aceti* Fr 63 ซึ่งมีสมบัติทนกรดแอซิดิก 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และทนแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มาศึกษาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (ADH) และอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (ALDH) จาก membrane fraction โดยเปรียบเทียบกับ *Acetobacter aceti* IF 03284 เป็นสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิปานกลาง พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *A. ceti* FI 24, *A. pasteurianus* Fr 56 และ *A. ceti* Fr 63 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH เท่ากับ 1.8 unit/mg, 2.6 unit/mg และ 1.9 unit/mg ตามลำดับ ขณะที่ *A. aceti* IF 03284 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH เท่ากับ 5.8 unit/mg ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *A. ceti* FI 24, *A. pasteurianus* Fr 56 และ *A. ceti* Fr 63 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH เท่ากับ 1.7 unit/mg, 3.2 unit/mg และ 1.3 unit/mg ตามลำดับ ขณะที่ *A. aceti* IF 03284 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH เท่ากับ 2.9 unit/mg สำหรับเอนไซม์ ALDH เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *A. ceti* FI 24, *A. pasteurianus* Fr 56 และ *A. ceti* Fr 63 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALDH เท่ากับ 2.1 unit/mg, 1.8 unit/mg และ 1.2 unit/mg ตามลำดับ ขณะที่ *A. aceti* IF 03284 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALDH เท่ากับ 3.1 unit/mg ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *A. ceti* FI 24, *A. pasteurianus* Fr 56 และ *A. ceti* Fr 63 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALDH เท่ากับ 1.0 unit/mg, 0.9 unit/mg และ 0.9 unit/mg ตามลำดับ ขณะที่ *A. aceti* IF 03284 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALDH เท่ากับ 1.1 unit/mg ดังแสดงในแผนภาพที่ 1

เมื่อนำ membrane fraction ของ *A. ceti* FI 24, *A. pasteurianus* Fr 56, *A. ceti* Fr 63 และ *A. aceti* IF 03284 ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส มาศึกษา protein profile พบ *A. ceti* FI 24, *A. pasteurianus* Fr 56 และ *A. ceti* Fr 63 ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีแถบ protein หนาขึ้น ที่น้ำหนักโมเลกุล 22 KDa ขณะที่ *A. aceti* IF 03284 ไม่พบแถบ protein ที่หนาขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 2

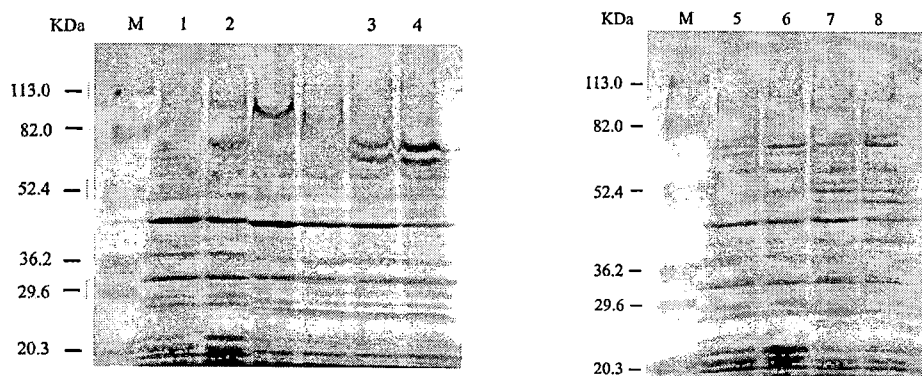
(ก)



(ข)



ภาพที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (ADH) และอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (ALDH) จาก membrane fraction ของ *A. ceti* F1 24, *A. pasteurianus* Fr 56 , *A. ceti* Fr 63 และ *A. aceti* IF 03284 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร seed culture ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2 SDS-PAGE จาก membrane fraction ของ *A. ceti* FI 24, *A. pasteurianus* Fr 56 ,
A. ceti Fr 63 และ *A. aceti* IF 03284

M = Molecular marker

- 1 = *A. pasteurianus* Fr 56 เจริญในอาหาร Seed culture ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
- 2 = *A. pasteurianus* Fr 56 เจริญในอาหาร Seed culture ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- 3 = *A. aceti* IF 03284 เจริญในอาหาร Seed culture ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
- 4 = *A. aceti* IF 03284 เจริญในอาหาร Seed culture ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- 5 = *A. aceti* FI 24 เจริญในอาหาร Seed culture ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
- 6 = *A. aceti* FI 24 เจริญในอาหาร Seed culture ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- 7 = *A. aceti* Fr 63 เจริญในอาหาร Seed culture ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
- 8 = *A. aceti* Fr 63 เจริญในอาหาร Seed culture ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

สรุป

จากการแยกแบคทีเรียกรดแอซิดิกจากผลไม้และดอกไม้สามารถแยกแบคทีเรียกรดแอซิดิกได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลต และนำมาทดสอบการทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดแอซิดิกและแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 30, 37, 40 และ 42 องศาเซลเซียสพบว่า มีจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ Fr45, Fr46, Fr56, Fr63 และ Fr69 สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ Fr46, Fr56 และ Fr63 สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ FI24 และ Fr63 สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ Fr56 สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ FI24 และ Fr63 สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ Fr56 สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีกรดแอซิดิก 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส สำหรับการทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์พบแบคทีเรียกรดแอซิดิกจำนวน 17 ไอโซเลตสามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีแอลกอฮอล์ 12 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ FI 19, FI 20, FI 24, FI 25, FI 26, FI 29, Fr35, Fr 36, Fr 37, Fr39, Fr 41, Fr 56, Fr 57, Fr 58, Fr 66, Fr 68 และ Fr 69 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 30 ไอโซเลต ได้แก่ FI 7, FI 19, FI 20, FI 21, FI 24, FI 25, FI 26, FI 29, FI 33, FI 34, Fr 35, Fr 36, Fr 37, Fr 38, Fr 39, Fr 41, Fr42, Fr 45, Fr 46, Fr 47, Fr 48, Fr 56, Fr 57, Fr 58, Fr 63, Fr 65, Fr 66, Fr 67, Fr 68 และ Fr 69 สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และไม่เจริญบนอาหารที่มีแอลกอฮอล์ 8-12 เปอร์เซ็นต์จำนวน 32 ไอโซเลต

จากการนำแบคทีเรียกรดแอซิดิกจำนวน 3 ไอโซเลตที่มีสมบัติในการทนกรดแอซิดิกได้สูงสุด 2-2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 40 และ 42 องศาเซลเซียส และแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้แก่ ไอโซเลต FI24, Fr56 และ FR63 มาจัดจำแนกพบว่า ไอโซเลต FI24 และ FR63 มีสมบัติตรงกับ *Acetobacter aceti* และ ไอโซเลต Fr56 มีสมบัติตรงกับ *Acetobacter pasteurianus*

เมื่อนำแบคทีเรีย *A. ceti* FI 24 , *A. pasteurianus* Fr 56 , *A. ceti* Fr 63 และ *A. aceti* IFO3284 มาศึกษาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (ADH) และอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (ALDH) จาก membrane fraction พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *A. ceti* FI 24, *A. pasteurianus* Fr 56 และ *A. aceti* Fr 63 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH เท่ากับ 1.7 unit/mg, 3.2 unit/mg และ 1.3 unit/mg

ตามลำดับ ขณะที่ *A. aceti* IF03284 มี กิจกรรมของเอนไซม์ ADH เท่ากับ 2.9 unit/mg สำหรับเอนไซม์ ALDH เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *A. ceti* Fl 24 , *A. pasteurianus* Fr 56 และ *A. ceti* Fr 63 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALDH เท่ากับ 1.0 unit/mg, 0.9 unit/mg และ 0.9 unit/mg ตามลำดับ ขณะที่ *A. aceti* IF03284 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALDH เท่ากับ 1.1 unit/mg ซึ่งสมบัติการทนกรดแอซิดิก ทนแอลกอฮอล์และทนอุณหภูมิสูง ไม่มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ ADH และ ALDH

เมื่อศึกษา protein profile จาก membrane fraction ของแบคทีเรีย *A. ceti* Fl 24 , *A. pasteurianus* Fr 56 และ *A. ceti* Fr 63 เปรียบเทียบกับ *A. aceti* IF03284 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *A. ceti* Fl 24 , *A. pasteurianus* Fr 56 และ *A. ceti* Fr 63 มีแถบ protein หนาขึ้นที่น้ำหนักโมเลกุล 22 KDa ส่วน *A. aceti* IF03284 ไม่พบแถบ protein ที่ หนาขึ้น การพบแถบ protein ที่หนาขึ้นน่าจะมีความสัมพันธ์กับสมบัติการทนกรดแอซิดิก ทนแอลกอฮอล์ และทนอุณหภูมิสูง

บรรณานุกรม

จิยากร โสระเสาร์. 2542. การคัดเลือกเชื้อกรดน้ำส้มที่ทนอุณหภูมิสูงจากผลไม้ และศึกษาความสามารถในการทนกรดแอซิดิกและแอลกอฮอล์. ปัญหาพิเศษทางชีววิทยา.
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

วราวุฒิ ครุสง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม.
พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์: กรุงเทพฯ.

ลดาวรรณ โพธิ์ทอง. 2542. การคัดเลือกเชื้อกรดน้ำส้มที่ทนอุณหภูมิสูงจากดอกของสมุนไพรร และศึกษาความสามารถในการทนกรดแอซิดิกและแอลกอฮอล์.
ปัญหาพิเศษทางชีววิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์
โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

วันเพ็ญ วรรณปะโพธิ์. 2543. การคัดเลือกเชื้อกรดน้ำส้มที่ทนอุณหภูมิสูงและศึกษาความสามารถในการทนกรดแอซิดิกและแอลกอฮอล์. ปัญหาพิเศษทางชีววิทยา.
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

อรพิน ภูมิภมร. 2526. จุลินทรีย์ที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมการเกษตร สิ่งแวดล้อม.
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อภิชาติ วิทย์ตะ. 2542. การคัดเลือกเชื้อกรดน้ำส้มที่ทนอุณหภูมิสูงจากผลไม้พื้นบ้านและความสามารถในการทนกรดแอซิดิกและแอลกอฮอล์. ปัญหาพิเศษทางชีววิทยา.
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

อังคณา บุญสุข. 2542. การคัดเลือกเชื้อกรดน้ำส้มที่ทนอุณหภูมิสูงจากดอกไม้ และศึกษาความสามารถในการทนกรดแอซิดิกและแอลกอฮอล์. ปัญหาพิเศษทางชีววิทยา.
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

- Buchanan, R., J. and N.E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed., Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1268 p.
- Deley, R., and F. Gossle. 1984. Key to the Genera of the Family Acetobacteraceae, pp. 276 – 278 In N. Krieg and J.G. Holt (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 1 The Williams & Wilkins company, Baltimore.
- Franke, I.H., M. Fegan, C. Hayward, G. Leonard, E. Stackebrandt and L.I. Sly. 1999. Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., new species of acetic acid bacteria isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. Inter.J.Syst.Bacteriol. 49: 1681-1693.
- Gilis, M. and J. Deley. 1980. Intra and Intergeneric Similarities of the Ribosomal Ribonucleic Acid Cistron of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. Int.J.Syst. Bacteriol. 30: 7-27.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Stalry and S.T. Willian. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed., Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 787 p.
- Lu, S.F., Lee, F.L., and H.K. Chen. 1999. A Thermotolerant and High Acetic Acid-Producing Bacterium *Acetobacter* sp. I14-2. J. of Appl. Microbiol. 86:55-62
- Ohmori, S., H. Masai, K. Arima and T. Beppu. 1980. Isolation and Identification of Acetic Acid Bacteria for Submerged Acetic Fermentation at High Temperature. J. Agric. Biol. Chem. 44: 2901-2906.
- Saeki, A., G. Theeragol, K. Matsushita, H. Toyama, N. Lotong and O. Adachi. 1997. Development of Thermotolerant Acetic Acid Bacteria Useful for Vinegar Fermentation at Higher Temperature. Biosci. Biotech. Biochem. 61 (1): 138-145.

- Saeki, A., G.Theeragol, K. Matsushita, H.Toyama, N,Lotong and O.Adachi. 1997.
Microbiological Aspects of Acetate Oxidation by Acetic Acid Bacteria
Unfavorable Phenomena in Vinegar Fermentation. Biosci. Biotech. Biochem.
61 (2): 317-323.
- Saeki, A. , K. Matsushita, S. Takeno, M,Taniguchi, H. Toyama, G.Theragool, N. Lotong
and O. Adachi. 1999. Enzymes Responsible for Acetate Oxidation by Acetic Acid
Bacteria. Biosci. Biotech. Biochem, 63 (12): 2101-2109.
- Schüller, G., C. Hertel and W.P. Hammes. 2000. Gluconacetobacter entanii sp. Nov.,
Isolate from submerged high-acid industrial vinegar frementation. Inter. J. Syst. Evol.
Microbiol. 50: 2013-2020.
- Yamada, Y.and Kondo, K. 1994. Gluconacetobacter, a new subgenus comprising the
acetate- oxidising acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus
Acetobacter. J. Gen. Appl. Microbiol. 30: 297-303.
- Yamada, Y. 2000. Transfer of Acetobacter oboediens Sokollek et al. 1998 and
Acetobacter intermedius Boesch et al. 1998 to the genus Gluconacetobacter as
Gluconacetobacter oboediens comb. nov. and Gluconacetobacter intermedius
comb.nov. Inter. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:2225-2227.
- Yamada, Y., Kondo, K.I. and I Shikawa, T. 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria
Base on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of subgenus
Gluconacetobacter to the generic level. Biosci.Biotechnol.Biochem. 16:124-1251
- Yamada, Y., K. Katsura, H. Kawasaki, Y.Widyastuti, S. Saono, T. Seki, T. Uchimura and
K. Komagata. 2000. Asaia bogorensis gen. Nov., sp.nov., an unusual acetic acid
bacterium in the α - Protobacteria. Inter. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 823-829.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

1.1 potato medium

ประกอบด้วย

glucose	5.0	กรัม
glycerol	20.0	มิลลิลิตร
yeast extract	10.0	กรัม
polypeptone	10.0	กรัม
potato extract	150.0	มิลลิลิตร (ประมาณ 3.3 กรัม)
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

1.2 seed culture

ประกอบด้วย

glucose	5.0	กรัม
glycerol	20.0	มิลลิลิตร
yeast extract	10.0	กรัม
polypeptone	10.0	กรัม
potato extract	150.0	มิลลิลิตร (ประมาณ 3.3 กรัม)
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

1.3 main medium

ประกอบด้วย

glucose	5.0	กรัม
glycerol	2.0	มิลลิลิตร
yeast extract	2.0	กรัม
polypeptone	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

1.4 อาหารทดสอบการเกิด overoxidation ประกอบด้วย

yeast extract	3.0	กรัม
agar	1.5	กรัม
bromocresol green	0.1	มิลลิลิตร

(ละลาย bromocresol green 2.2 กรัม ใน เอทานอล 100 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
เอทานอล	2.0	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นถึง 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติมเอทานอล

2. ทดสอบแคตาเลส

Hydrogen peroxide 3.0 เปอร์เซ็นต์

3. การย้อมสีแบบแกรม

1. เกลียเช็บบนสไลด์ให้แห้งแล้วฟอกด้วยความร้อน หยดสียคริสตัลไวโอเล็ต (crystalviolet) ลงบนเชื้อเป็นสีแรก เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด
2. หยดสารละลายไอโอดีน จะช่วยให้สีติดเซลล์มากขึ้น เวลา 30 วินาที
3. ล้างสีออกด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลา 5 วินาที
4. ใช้สีซาฟานิน (safanin) ย้อมทับเป็นสีที่สอง
5. ซับสไลด์ให้แห้ง แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วง แบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง

4. อาหารที่ใช้จัดจำแนกสปีชีส์

4.1 การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Formation of H_2S)

ในการทดสอบใช้ อาหาร TSI

4.2 การสร้างสีน้ำตาลบนอาหาร GYC medium

(Formation of water-soluble brown pigment on GYC medium)

อาหารประกอบด้วย

D-glucose	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม

CaCO₃ 3 กรัม

น้ำกลั่น

100.0 มิลลิกรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำออกมาจุ่มน้ำเย็นทันที

4.3 γ -pyrones from D-glucose / D-fructose

อาหารประกอบด้วย

Yeast extract 1 กรัม

CaCO₃ 3 กรัม

D-fructose /D-glucose 5 กรัม

น้ำกลั่น 100.0 มิลลิตร

FeCl₃ (5% w/v) 1 มิลลิตร (ใส่หลังจากบ่มแล้ว 11 วัน)

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที เมื่อนำออกจาก autoclave นำมาจุ่มน้ำเย็นทันที

4.4 Ketogenesis from glycerol (Dihydroxyacetone)

อาหารประกอบด้วย

Glycerol 30.0 กรัม

Yeast extract 30.0 กรัม

Agar 15.0 กรัม

น้ำกลั่น 1000.0 มิลลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที เมื่อนำออกจาก autoclave ให้นำมาจุ่มน้ำเย็นทันที

Stock Fehling solution:

A. CuSO₄.5H₂O 34.4 กรัม ในน้ำ 500 มิลลิตร

B. โซเดียมโพแตสเซียมทาทเรต 173.0 กรัม

NaOH 50.0 กรัม

ในน้ำ 500 มิลลิตร

เมื่อจะใช้ให้นำ Fehling A มาผสมกับ Fehling B ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

4.5 การเจริญบนเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ (Growth in the presence of 10 % ethanol)

อาหารประกอบด้วย

Glucose 1.5 กรัม

Yeast extract	0.2	กรัม
Peptone	0.3	กรัม
Acetic acid	1.0	เปอร์เซ็นต์
Ethanol	10.0	มิลลิลิตร
Agar	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นถึง 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติม Acetic acid และ ethanol

4.6 อาหารวุ้น Hoyer-Frateur

อาหารประกอบด้วย

Ethanol	30.0	มิลลิลิตร
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.1	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.9	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25	กรัม
FeCl ₃	0.005	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นถึง 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติม ethanol

4.7 อาหาร MGY (Mannitol Glucose Yeast extract Peptone)

อาหารประกอบด้วย

Mannitol	20.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Polypeptone	5.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

4.8 การเจริญบน 30 % D-glucose (growth on 30% D-glucose)

อาหารประกอบด้วย

Yeast extract	0.5	กรัม
Polypeptone	0.2	กรัม
Glucose	30.0	กรัม
Agar	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที
เมื่อนำออกจาก autoclave ให้จุ่มน้ำเย็นทันที

4.9 เจริญในเมทานอล (Methanol)

อาหารประกอบด้วย

-1% Methanol

- 31% or 62 mg P/L (68.05 g KH_2PO_4 + 87.09 K_2HPO_4 / L)

ใช้ 1 หรือ 2 ml

- 200 mg N/L (NH_4Cl 152.28 g/L) ใช้ 1.0 ml/L

หรือ NaNO_3 121.3 g / L ใช้ 10.0 ml/L

-1 mg Ca /L ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5.47 g / L) ใช้ 1.0 ml/L

- yeast extract 0.5 g or 1.0 g / L

- agar 20.0 g

- 1 ml of tract element / L

($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 71.2 g + $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.44 g + $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.812 g + $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.785 g +
 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.252 g + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.98 g) / L

pH 4.0–5.4

4.10 การสร้างกลูโคส (Formation of glucose)

อาหารประกอบด้วย

Yeast extract	3.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
CaCO_3	3.0	กรัม

Agar	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที

เมื่อนำออกจาก autoclave ให้จุ่มน้ำเย็นทันที

4.11 การสร้างเซลลูโลส (Production of cellulose)

อาหารประกอบด้วย

น้ำมะพร้าวแก่	100.0	มิลลิลิตร
น้ำตาลทราย	5.0	กรัม
CH ₂ COOH	1.0	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที

ประวัติย่อนักวิจัย

ชื่อ วัชร กัญจนรัช
ตำแหน่ง อาจารย์
สถานที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต. ขามเรียง
อ. กันทรวิชัย จ. มหาสารคาม 44150
โทรศัพท์ 0-4375-4321 ต่อ 1162
โทรสาร 0-4375-4245
E- mail wkanchanarach@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2541	ว.ทม.จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
พ.ศ. 2533	ว.ทบ.(โรคพืช)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

งานสอน

วิชาจุลชีววิทยา วิทยาเห็ด-รา สรีรวิทยาของจุลินทรีย์ และจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

งานวิจัย

1. Moonmangmee, S.,D. Moonmangmee, **W. Kanchanarach**, O. Adachi, H.Toyama and K. Matsushita.2004.Diversity of pellicle polysaccharide from thermotolerant *Acetobacter* species. Abstracts of the 4th JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications.Yamaguchi, Japan.
2. **Kanchanarach, W.**,G. Theeragool, H.Toyama, O. Adachi and K. Matsushita. 2002.Characterization and Purification of Thermostable membrane – bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter* sp. MSU 10 .Abstracts of the 3rd JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications.Yamaguchi,Japan. P. 31.
3. **Kanchanarach, W.**,W. Pathom-Aree, G. Theeragool, N. Lotong, H.Toyama,K. Matsushita and O. Adachi. 2000. Isolation and Characterization of Thermotolerant Acetic Acid Bacteria Isolated in Thailand.Abstracts of the 2nd JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications. Yamaguchi, Japan. P. 73.

4. **Jaiwisuthunsa, W.**, G. Theeragool, W. Pothachareon and Lotong.1998.

Plasmid Curing and Identification of Thermotolerant Acetic Acid Bacteria Isolated in Thailand.

Abstracts of the 1st JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Microbial Resources and

Their Applications in Thailand and Japan. Bangkok, Thailand. P. 86.

5. Theeragool, G., N. Lotong, **W. Jaiwisuthunsa**, K. Matsushita and O. Adachi.

1998.Genetic variation and distribution of insertion sequence, *IS* 1380 in thermotolerant acetic

acid bacteria. Abstracts of the 1st JSPS- NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant

Microbial Resources and Their Applications in Thailand and Japan. Bangkok, Thailand. P 82.

สรุปรายงานการใช้จ่ายเงิน

รายการ	งบประมาณ (บาท)
หมวดค่าวัสดุ	
1. ค่าอุปกรณ์วิทยาศาสตร์และสารเคมี	22,500
2. ค่าจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์	1,500
หมวดค่าตอบแทน	
1. ค่าตอบแทนผู้วิจัย	6,000
รวมงบประมาณทั้งโครงการ	30,000 บาท (สามหมื่นบาทถ้วน)