รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

อนุกรมวิธานและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดอะซิติก

โดย

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์
สุวิมล กีรติพิบูล

579.33
ส 257อ

พฤษภาคม 2542

TH
ฉ 01-41

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

อนุกรมวิธานและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดอะซิติก

โดย

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

สุวิมล กีรติพิบูล

พฤษภาคม 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากได้รับเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชเพื่อใช้ในการวิจัยรวมทั้งได้รับความร่วมมืออย่างดียิ่งจากฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในด้านการประสานงานต่าง ๆ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลมาศ ลีปิพันธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ทำงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณไพพรรณ บุดกะ เจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ที่ให้ตัวอย่างเชื้อมาตรฐานมาใช้ในงานวิจัยนี้และสุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุก ๆ ท่านของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกมาโดยตลอด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย อนุกรมวิธานและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดอะซิติก
ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กีรติพิบูล
เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ พฤษภาคม 2542

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาอนุกรมวิธานและการใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดและเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกที่แยกได้จากผลไม้ ดอกไม้ และวัสดุที่เกี่ยวข้อง ผลการแยกเชื้อจากผลไม้ 37 ชนิด ดอกไม้ 8 ชนิด และวัสดุอื่นๆ 4 ชนิด ได้เชื้อจำนวน 216 สายพันธุ์ เชื้อจำนวน 204 สายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดอะซิติกในช่วง 0.01-1.45 กรัม / 100 มิลลิลิตร และ 12 สายพันธุ์สามารถผลิตเซลลูโลสได้ จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา ชีวเคมี และระบบยูบิควิโนน รวมทั้งการศึกษา DNA-DNA homology ของเชื้อตัวแทน พบว่าสามารถแบ่งเชื้อที่คัดเลือกได้ 142 สายพันธุ์เป็น 5 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 52 สายพันธุ์พิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Acetobacter pasteurianus* กลุ่มที่ 2 จำนวน 35 สายพันธุ์เป็น *Acetobacter aceti* เชื้อทั้ง 2 กลุ่มนี้มีระบบยูบิควิโนนเป็นชนิด Q-9 ส่วนเชื้อกลุ่มที่ 3 จำนวน 12 สายพันธุ์เป็น *Gluconoacetobacter xylinus* กลุ่มที่ 4 จำนวน 6 สายพันธุ์เป็น *Gluconoacetobacter liquefaciens* และกลุ่มที่ 5 จำนวน 37 สายพันธุ์เป็น *Gluconobacter* sp. เชื้อทั้ง 3 กลุ่มนี้มีระบบยูบิควิโนนเป็นชนิด Q-10 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผลไม้พบว่าไม่มีผลต่อการกระจายของสปีชีส์ของแบคทีเรียกรดอะซิติก

ในการศึกษาภาวะการผลิตกรดอะซิติกของเชื้อที่คัดเลือกไว้ 5 สายพันธุ์ คือ *A. pasteurianus* GR 24-2, OR 56-1, BS 58-2, MG 69-2 และ *A. aceti* SF 18-1 เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน (Type strain) *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^T และ *A. pasteurianus* TISTR 1056^T พบว่าปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดได้แก่ ปริมาณเอธานอล ปริมาณกรดอะซิติก ปริมาณกรดคาซามิโน และอุณหภูมิในการหมัก จากผลการทดลองพบว่าเชื้อตัวแทนสามารถผลิตกรดได้สูงสุดในอาหารที่เติมเอธานอล 4.0% (v/v) กรดอะซิติก 0.5 หรือ 1.0% (v/v) กรดคาซามิโน 0.5% (w/v) และการหมักที่อุณหภูมิ 30-37 °ซ. นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสายพันธุ์ OR 56-1 สามารถผลิตกรดได้ที่อุณหภูมิ 40 °ซ. โดยมีค่าการหมักสัมพัทธ์ (Relative fermentation) เมื่อเทียบกับที่ 30 °ซ. เป็น 69.5% ในวันที่ 3 ของการหมัก การศึกษาการผลิตเซลลูโลสโดยใช้เชื้อตัวแทนที่คัดเลือกได้ 6 สายพันธุ์ คือ *Gluconoacetobacter xylinus* BB150-1, MM 151-1, JF 152-1, BS 153-1, AP154-1 และ LD 155-1 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *Gluconoacetobacter xylinus* TISTR 893 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวเป็นเวลา 14 วัน พบว่าเซลลูโลสที่ได้มีค่า น้ำหนักเปียก น้ำหนักแห้ง และค่าเนื้อสัมผัสเป็น 165.41-209.71 กรัม 9.10-11.53 กรัม และ 49.65-56.51 นิวตัน ตามลำดับ ผลการทดสอบด้านความหนาและค่าเนื้อสัมผัสของเซลลูโลสที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ($P \leq 0.05$)

Project Title	Systematic and applications of acetic acid bacteria
Name of the Investigators	Assoc. Prof. Dr. Somboon Tanasupawat and Assist. Prof. Dr. Suwimon Keeratipibul
Year	May 1999

Abstract

Systematics and the applications in acetic acid and cellulose production of acetic acid bacteria isolated from fruits, flowers, and related materials were studied. Two hundred and sixteen strains were isolated from 37 kinds of fruits, 4 kinds of flowers, and 4 kinds of related materials. Two hundred and four strains produced acetic acid ranged from 0.01-1.45 g/100 ml. Twelve strains could produce cellulose. The strains which produced high yield of acetic acid and cellulose were selected for acetic acid and cellulose production. Based on morphological, cultural, physiological, and biochemical characteristics including ubiquinone system and DNA-DNA homology, the selected 142 strains were separated in 5 groups. Group 1, 52 strains were identified as *Acetobacter pasteurianus* and Group 2, 25 strains were *A. aceti*. They contained ubiquinone with 9 isoprene unit (Q-9) as a major component. Group 3, 12 strains were identified as *Gluconoacetobacter xylinus* ; Group 4, 6 strains were *Gluconoacetobacter liquefaciens* ; and Group 5, 37 strains were *Gluconobacter* sp. They had Q-10 as a major ubiquinone. The distribution of species of acetic acid bacteria was not depended on the amount of sugar in fruits.

The conditions of acetic acid production from 5 selected strains of *A. pasteurianus* GR 24-2, OR 56-1, BS 58-2, MG 69-2 and *A. aceti* SF 18-1 were studied comparing with *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^{T} and *A. pasteurianus* TISTR 1056^{T} (T = type strain). Concentration of ethanol, acetic acid, casamino acid, and temperature affected on acetic acid production. The results showed that selected strains produced the highest amount of acetic acid when suplemented with 4.0% (v/v) ethanol, 0.5-1.0% (v/v) acetic acid, and 0.50% (w/v) casamino acid, and incubated at 30-37 °C. At 40 °C, strain OR 56-1 could produce acetic acid by the relative fermentation rate of 69.5% when compared with the rate at 30 °C in the third day of fermentation. Cellulose production of 6 selected strains of *Gluconoacetobacter xylinus* BB 150-1, MM 151-1, JF 152-1, BS 153-1, AP154-1, and LD 155-1 was compared with *Gluconoacetobacter xylinus* TISTR 893 in Coconut juice medium for 14 days. The result showed that the wet weight, dry weight, and texture of cellulose were 165.41-209.71 g., 9.10-11.53 g., and 49.65-56.51 N., respectively. The thickness and texture of these cellulose pellicles were not statically different ($P \leq 0.05$).

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ii
บทคัดย่อภาษาไทย.....iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....iv
สารบัญ.....v
รายการตารางประกอบ.....vi
รายการรูปประกอบ.....xi
คำย่อ.....xii
บทที่
1 บทนำ.....1
2 การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....9
4 ผลการวิจัย.....22
5 การอภิปรายผล.....93
6 ข้อสรุป.....100
7 ข้อเสนอแนะ.....101
บรรณานุกรม.....102
ภาคผนวก ก.....109
ภาคผนวก ข.....127

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ หน้า

2.1 ลักษณะความแตกต่างระหว่างเชื้อ *G. oxydans*, *G. cerinus* และ *G. asaii* 6

4.1 วันเดือนปีที่แยก ชนิดของวัสดุที่ใช้แยก แหล่งที่มา รหัสของเชื้อ และคุณสมบัติบางประการของเชื้อ.....23

4.2 เชื้อสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะซิติก.....32

4.3 เชื้อสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส.....32

4.4 ผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อที่แยกได้.....35

4.5 ลักษณะของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกที่แยกได้.....65

4.6 ลักษณะความแตกต่างของเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน.....69

4.7 การกระจายของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกในผลไม้ ดอกไม้ และ วัสดุชนิดต่างๆ.....70

4.8 DNA relatedness ของเชื้อ *A. pasteurianus* (กลุ่มที่ 1).....74

4.9 DNA relatedness ของเชื้อ *A. aceti* (กลุ่มที่ 2).....75

4.10 DNA relatedness ของเชื้อ *Gluconoacetobacter liquefaciens* (กลุ่มที่ 4).....76

4.11 DNA relatedness ของเชื้อ *Gluconobacter* sp. (กลุ่มที่ 5).....76

4.12 ผลของเอธานอลที่เติมต่อปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตได้ในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ.....78

4.13 ผลของกรดอะซิติกที่เติมต่อปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตได้ในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ....81

4.14 ผลของกรดคาซามิโนที่เติมต่อปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตได้ในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ.....84

4.15 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ต่อการผลิตกรดอะซิติกที่ได้ในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ.....87

4.16 ความหนา (มม.) ของชั้นเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้ในวันที่ 3, 6, 9, 12 และ 14 ของการหมักในอาหารเหลวสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.7) ของเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้.....90

4.17 น้ำหนักเปียก น้ำหนักแห้ง (กรัม) และแรงสูงสุด (N.) ที่เจาะทะลุผ่านของชั้นเซลลูโลสภายหลังการหมัก 14 วัน.....92

รายการตารางประกอบ (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ก.1 ลักษณะสีที่ปรากฏภายใต้แสงปกติ และรังสีอัลตร้าไวโอเลตบนโครมาโตรแกรม.....119

ข.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับเอธานอลในอาหารเหลว Y (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.1) ของเชื้อรหัส SF18-1 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....127

ข.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับเอธานอลในอาหารเหลว Y (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.1) ของเชื้อรหัส GR 24-2 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....127

ข.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับเอธานอลในอาหารเหลว Y (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.1) ของเชื้อรหัส OR 56-1 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....127

ข.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับเอธานอลในอาหารเหลว Y (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.1) ของเชื้อรหัส BS 58-2 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....127

ข.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับเอธานอลในอาหารเหลว Y (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.1) ของเชื้อรหัส MG 69-2 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....128

ข.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับเอธานอลในอาหารเหลว Y (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.1) ของเชื้อรหัส TISTR 354^{T} ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....128

ข.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดอะซิติกในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ของเชื้อรหัส SF18-1 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....128

ข.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดอะซิติกในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ของเชื้อรหัส GR 24-2 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....128

รายการตารางประกอบ (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ข.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดอะซิติกในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ของเชื้อรหัส OR56-1 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....129

ข.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดอะซิติกในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ของเชื้อรหัส BS58-2 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....129

ข.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดอะซิติกในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ของเชื้อรหัส MG 69-2 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....129

ข.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดอะซิติกในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ของเชื้อรหัส TISTR 354^{T} ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....129

ข.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดซามิโนในอาหารเหลว EAY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.2) ของเชื้อรหัส SF18-1 ที่ 30 °ซ.ในวันที่ 3 ของการหมัก.....130

ข.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดซามิโนในอาหารเหลว EAY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.2) ของเชื้อรหัส GR 24-2 ที่ 30 °ซ.ในช่วงเวลาของการหมัก.....130

ข.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดซามิโนในอาหารเหลว EAY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.2) ของเชื้อรหัส OR 56-1 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....130

ข.16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดซามิโนในอาหารเหลว EAY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.2) ของเชื้อรหัส BS 58-2 ที่ ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....130

ข.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดซามิโนในอาหารเหลว EAY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.2) ของเชื้อรหัส MG 69-2 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....131

รายการตารางประกอบ (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ข.18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดซามิโน ในอาหารเหลว EAY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.2) ของเชื้อรหัส TISTR 354^{T} ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก.....131

ข.19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิ ที่ใช้ในการหมัก ในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส SF18-1 ในวันที่ 3 ของการหมัก.....131

ข.20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิ ที่ใช้ในการหมัก ในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส GR 24-2 ในวันที่ 3 ของการหมัก.....131

ข.21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิ ที่ใช้ในการหมัก ในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส OR 56-1 ในวันที่ 3 ของการหมัก.....132

ข.22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิ ที่ใช้ในการหมัก ในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส BS 58-2 ในวันที่ 3 ของการหมัก.....132

ข.23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิ ที่ใช้ในการหมัก ในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส MG 69-2 ในวันที่ 3 ของการหมัก.....132

ข.24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิ ที่ใช้ในการหมัก ในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส TISTR 354^{T} ในวันที่ 3 ของการหมัก.....132

ข.25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิ ที่ใช้ในการหมัก ในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส TISTR 1056^{T} ในวันที่ 3 ของการหมัก.....133

ข.26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความหนาของชั้นเซลลูโลส (มม.) ในวันที่ 3, 6, 9, 12 และ 14 ของการหมักในอาหารเหลวสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.7) ของเชื้อรหัส BB 150-1, WM 151-1, JF 152-1, BS 153-1, AP 154-1, LD 155-1 และ TISTR 893.....133

รายการตารางประกอบ (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ข.27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักเปียก น้ำหนักแห้ง (กรัม) และแรงสูงสุดที่เจาะทะลุผ่าน (N.) ของชั้นเซลลูโลส ภายหลังจากการหมัก 14 วันในอาหารเหลวสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.7) ของเชื้อรหัส BB 150-1, WM 151-1, JF 152-1, BS 153-1, AP 154-1, LD 155-1 และ TISTR 893.....133

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

รูปที่

หน้า

2.1 ลักษณะความแตกต่างของสกุลของแบคทีเรียกรดอะซิติก.....6
4.1 ผลของปริมาณเอธานอลที่เติมต่อปริมาณกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆในวันที่ 3 ของการหมัก.....73
4.2 ผลของปริมาณกรดอะซิติกที่เติมต่อปริมาณกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆในวันที่ 3 ของการหมัก.....82
4.3 ผลของปริมาณกรดคาซามิโนที่เติมต่อปริมาณกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆในวันที่ 3 ของการหมัก.....85
4.4 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ต่อปริมาณกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆในวันที่ 3 ของการหมัก.....88
4.5 ค่าการหมักสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 °ซ. ของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิในการหมักที่ 30 °ซ.....89
4.6 ความหนาของชั้นเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อตัวแทนที่แยกได้ (มม.).....91

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

°ซ.	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
O.D.	=	Optical density
นม.	=	นาโนเมตร
v/v	=	volume/volume
w/v	=	weight/volume
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
ชม.	=	ชั่วโมง
มก.	=	มิลลิกรัม
กก.	=	กิโลกรัม
TSS	=	Total soluble solid
°B	=	องศาบริกซ์ (Brix)
TISTR	=	Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

แบคทีเรียกรดอะซิติก (Acetic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียในสกุล *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas* และ *Gluconoacetobacter* (De Ley และคณะ, 1984 ; Urakami, 1989; Holt และคณะ, 1994 ; Yamada และคณะ, 1997 ; Stackebrandt, 1998.) โดยเฉพาะ *Acetobacter* ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู เชื้อ *Gluconoacetobacter xylinus* ใช้ในการผลิตวุ้นสวรรค์ หรือวุ้นมะพร้าว เชื้อ *Gluconobacter* ใช้ผลิตกรดกลูโคนิค กรด 2 หรือ 5-คีโตกลูโคนิค (Ketogluconic acid) และ ซอร์โบส นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อการศึกษาทางชีวเคมีของกลไกการเกิดออกซิเดชั่น (Oxidation) ของเอธานอล โพลีแอลกอฮอล์ และน้ำตาล (Asai,1968; Swings, 1992) แบคทีเรียกรดอะซิติกมีลักษณะเซลล์รูปร่างแท่ง ย้อมสีติดแกรมลบ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา มักเรียงตัวเป็นเซลล์เดียว เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ มักพบเชื้อทั้งสองสกุลปะปนกันเพราะสามารถเจริญได้ดีในสิ่งแวดล้อมที่คล้ายคลึงกัน (De Ley และ Frateur, 1974) ปัจจุบันจำแนกเชื้อ *Acetobacter* เป็น *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *A. polyoxygenes* และ *A. peroxydans* เชื้อ *Gluconobacter* เป็น *G. asaii*, *G. cerinus*, *G. oxydans* และ *G. frateurii* และจำแนกเชื้อ *Gluconoacetobacter* เป็น *Ga. hansenii*, *Ga. liquefaciens*, *Ga. methanolicus*, *Ga. europaeus* และ *Ga. xylinus* (Entani และคณะ, 1985; Mason และ Claus, 1989; Sievers และคณะ, 1992; Swings, 1992; Stackebrandt, 1998.)

การผลิตน้ำส้มสายชูในปัจจุบันใช้เชื้อ *A. aceti* หรือ *A. pasteurianus* ซึ่งจำเป็นต้องใช้ระบบหล่อเย็น (Cooling system) เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมในการผลิต ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในระบบนี้ค่อนข้างสูง เชื้อที่เจริญได้ในที่อุณหภูมิสูงและสามารถผลิตกรดได้ดีจะช่วยแก้ปัญหานี้ได้ ส่วนวุ้นสวรรค์หรือวุ้นน้ำมะพร้าวเป็นผลิตผลจากเชื้อ *Gluconoacetobacter xylinus* โดยวุ้นที่ได้จะมีลักษณะเป็นเยื่อเหนียว มีสีขาว หรือสีครีม สามารถนำมาใช้ในการประกอบอาหารได้หลายชนิดรวมทั้งในอุตสาหกรรมการผลิตเส้นใยเซลลูโลส ในประเทศฟิลิปปินส์ซึ่งมีน้ำมะพร้าวเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานมะพร้าวนิยมใช้เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้เพื่อผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว (สมศรี, 2531; Adams, 1985; Nickol, 1976; De Jesus และคณะ, 1971) ยังพบว่า *Gluconoacetobacter xylinus* สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ชนิด AM-2 ประกอบด้วย ดี-กลูโคส (D-glucose) แอล-แรมโนส (L-rhamnose) ดี-แมนโนส (D-mannose) กรด ดี-กลูคูโรนิค (D-glucuronic acid) และ ออร์โท-อะซิติล (O-acetyl) ในอัตราส่วน 4:1:1:1:1 (Tayama และคณะ,1985) และ *Acetobacter* sp. สามารถผลิตสารผสมระหว่าง (1⟶2)-β-D-glucose และ (1⟶2)-β-D-gluco-oligosaccharides (Amemura และคณะ, 1985)

แนวคิดการศึกษาอนุกรมวิธานแบคทีเรียกรดอะซิติกในประเทศไทยเพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐาน โดยศึกษาการจำแนกทางเคมี (Chemotaxonomy) และการใช้ DNA-DNA homology รวมทั้งลักษณะทางฟีโนไทป์อื่นๆ เพื่อบ่งบอกความแตกต่างของสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน (Type strain) ซึ่งจะทำให้เกิดการค้นพบใหม่หรือการนำเชื้อที่คัดเลือกและเชื้อซึ่งแตกต่างจากที่เคยมีรายงานมาใช้ประโยชน์เนื่องจากแบคทีเรียกรดอะซิติกกระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติโดยเฉพาะในผลไม้ ดอกไม้ เบียร์ น้ำอ้อย เนื้อหมัก และแป้ง (Swings, 1992) ในประเทศไทยก็พบแบคทีเรียกรดอะซิติกในผลไม้ และวัสดุธรรมชาติหลายชนิด (ณัฐดา และสมบูรณ์, 2533; ชินปัญญ์ และคณะ, 2540) Sasazaki และคณะ (1997) ศึกษาเชื้อ *Gluconoacetobacter hansenii* ("*Acetobacter hansenii*" CF1-3) จากผลไม้ของไทยพบว่าสามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงถึง 30.7 g/m^2 ในภาวะนิ่ง และ 2.28 g/l. เมื่อใช้แมนโนสเป็นแหล่งคาร์บอนในระบบการกวน (Agitation) Theeragool และคณะ (1997) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) ของ "*Acetobacter lovaniensis*" ซึ่งสามารถผลิตกรดได้ที่อุณหภูมิสูง โดยแยกเชื้อจากผลไม้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ สมบูรณ์ และคณะ (2541) ก็พบเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกจากผลไม้ต่างๆ ของไทยซึ่งจำแนกได้ 3 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี พบว่าบางสายพันธุ์สามารถทนอุณหภูมิสูงได้แต่ยังไม่มีการศึกษาเชื้อเหล่านี้ในการจำแนกโดยอาศัยการวิเคราะห์สารประกอบยูบิควิโนน (Ubiquinone) และ DNA-DNA homology ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้อาจจะทำให้พบเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตกรดได้สูง และผลิตวุ้นหรือเซลลูโลสที่มีคุณภาพดีและสามารถทนต่อภาวะความเป็นกรดและอุณหภูมิสูงได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรียกรดอะซิติกจัดอยู่ในตระกูล Acetobacteraceae มีลักษณะเซลล์กลมรี จนถึงรูปร่างเป็นท่อน การเรียงตัวของเซลล์มีหลายลักษณะ อาจพบเซลล์อยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่ เรียงตัวเป็นสายยาว หรือเป็นสายสั้นๆไม่พบเอนโดสปอร์ (Endospore) เซลล์ติดสีแกรมลบ แต่เมื่อเซลล์อายุมากขึ้นอาจย้อมติดแกรมบวกบ้างเนื่องจากผนังเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป เชื้อกลุ่มนี้ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาชนิดรอบเซลล์หรือขั้วเซลล์ ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ (Pigment) แต่เมื่อมาอยู่รวมกันมากๆ อาจเห็นเป็นสีชมพูของสารพอร์ไฟริน(Porphyrin) บางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล เชื้อกลุ่มนี้ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (Obligate aerobe) เพราะไม่สามารถใช้สารอื่นนอกจากออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้ายในกระบวนการเปลี่ยนอาหารให้เป็นพลังงาน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อนี้จะแตกต่างกัน ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ 15-34 °ซ เจริญได้ที่ในช่วงความเป็นกรดเป็นด่าง 5.4-6.3 (De Ley และ Frateur, 1974) มีผู้รายงานว่าพบเชื้อนี้ในผลไม้ น้ำส้มสายชู น้ำตาลสด น้ำตาลเมา กระแช่ ลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า (นภา, 2520) ทางยุโรปพบ *Gluconoacetobacter europaeus* เป็นเชื้อชนิดใหม่ซึ่งใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู (Sievers และคณะ, 1992; Sievers และ Teuber, 1995) การผลิตน้ำส้มสายชูเมื่อมีการเติมกรดคาซามิโน (Casamino acid) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้เชื้อเจริญได้ดีและผลิตกรด อะซิติกได้มากขึ้น (Mori และ Harada,1973) ในน้ำส้มสายชูจากการหมักตามธรรมชาติจะพบสารประกอบอะเซตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) อะซิเตท (Acetate) เอทิลอะซิเตท (Ethylacetate) และเอธานอล นอกจากนี้ยังพบคาร์บอนิล(Carbonyl) แอลกอฮอล์ และเอสเทอร์ที่ช่วยทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีของน้ำส้มสายชู (Aurand และ Singleton, 1996)

การศึกษาทางอนุกรมวิธานในประเทศแถบยุโรปและอเมริกา Asai (1968) ได้กล่าวว่า Beijerink (1898) พบเชื้อ*Acetobacter aceti* และ Kluyver (1925) พบ "*Gluconobacter suboxydans*" ต่อมามีการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดอะซิติกเป็น 2 สกุล คือ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ตามลักษณะความแตกต่างของการออกซิไดส์อะซิเตท ซึ่งสกุล *Acetobacter* สามารถออกซิไดส์อะซิเตทได้ ต่อมา Leifson (1954) ได้จำแนกเชื้อกลุ่มนี้ใหม่เป็น 2 สกุล คือ *Acetobacter* สำหรับเชื้อกลุ่มที่สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและมีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบรอบเซลล์ (Peritrichous flagella) และสกุล "*Acetomonas*" ซึ่งมีแฟลกเจลลาแบบขั้วเซลล์ (Polar flagella) และไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเตท Gillis และ De Ley (1980) ได้ศึกษาความคล้ายคลึงกันของ intra- และ intergeneric ของ ribosomal ribonucleic acid cistrons ของ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* Gossele และคณะ (1983) ได้ศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และ protein gel electrophoregrams ของเชื้อ *Acetobacter* และจำแนกเชื้อสกุลนี้ได้หลายสปีชีส์ รวมทั้งเสนอ

"*Acetobacter hansenii*" เป็นเชื้อชนิดใหม่ Uhlig และคณะ (1986) ได้พบแบคทีเรียกรดอะซิติกชนิดใหม่ คือ "*Acetobacter methanolicus*" ซึ่งแยกได้จากกระบวนการหมักยีสต์ โดยใช้เมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน Gillis และคณะ (1989) พบแบคทีเรียอะซิติกชนิดใหม่คือ "*Acetobacter diazotrophicus*" ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจน (Nitrogen-fixing) โดยแยกได้จากต้นอ้อย Mason และ Claus (1989) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางฟีโนไทป์และ DNA sequence similarities ของเชื้อ *Gluconobacter* ทั้ง 3 สปีชีส์ คือ *G. oxydans,G. frateurii* และ *G. asaii* Bulygina และคณะ (1992) ได้ศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ *Acidomonas, Acetobacter* และ *Gluconobacter* โดยใช้ 5S ribosomal RNA sequencing ในปีเดียวกัน Sievers และคณะ พบ "*Acetobacter europaeus*" ซึ่งเป็นเชื้อชนิดใหม่ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชูในประเทศเยอรมันนีและสวิสเซอร์แลนด์ Sievers และคณะ (1994) พบว่าจากข้อมูลด้าน phylogenetic นั้นเชื้อ "*Acetobacter methanolicus*" มีความแตกต่างจาก "*Acidomonas methanolica*"

ในประเทศญี่ปุ่น Yamada และคณะ (1968; 1969a, b) ได้ศึกษาการกระจายของสารประกอบยูบิควิโนน (Q10, Q-9 และ Q-8) ในแบคทีเรียกรดอะซิติกและความสัมพันธุ์กับการจัดจำแนกเชื้อ *Gluconobacter* และ *Acetobacter* เขายังพบว่า "*A. xylinum*" มีระบบควิโนนเป็น Q-10 (Yamada และคณะ, 1976a;1976b) และเสนอเป็นเชื้อชนิดใหม่ (Yamada และคณะ, 1983) เขาศึกษา DNA base composition, DNA homology และ cellular fatty acid ของแบคทีเรียกรดอะซิติกพวก polarly flagellated intermediate ของ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* (Yamada และคณะ, 1981a;1981b) และศึกษาเกี่ยวกับ restriction endonuclease ของ "*A. liquefaciens*" (Yamada และคณะ, 1983) และเอนไซม์ของ *Gluconobacter* (Yamada et al., 1984a) รวมทั้งศึกษา DNA homology ของ *Gluconobacter* ด้วย (Yamada และคณะ., 1984b) Yamada และ Kondo (1984) ได้เสนอ *Gluconoacetobacter* เป็นเชื้อ subgenus ใหม่ในปี ค.ศ. 1985 Entani และคณะ ได้เสนอ "*Acetobacter polyoxygenes*" เป็นเชื้ออะซิติกชนิดใหม่ และมีคุณสมบัติในการผลิตกรดได้ปริมาณสูง Urakami และคณะ (1989) พบ "*Acidomonas methanolica*" ซึ่งใกล้เคียงกับเชื้อ *Acetobacter*

ปัจจุบันแบคทีเรียกรดอะซิติกแบ่งได้เป็น 4 สกุล ดังนี้ (Yamada และคณะ, 1997)

เชื้อ *Acetobacter* สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท มีระบบยูบิควิโนนเป็นชนิด Q-9 แต่ไม่สามารถออกซิไดส์ซอร์บิทอลและเมธานอล เชื้อสกุลนี้แบ่งออกเป็น 5 สปีชีส์ ได้แก่

1.) *A. aceti* แบ่งเป็น *A. aceti* subsp. *aceti* และ *A. aceti* subsp. *orleanensis* ซึ่งทั้งสองมีลักษณะที่แตกต่างกันคือ *A. aceti* subsp. *aceti* เจริญได้ใน Hoyer-Frateur agar แต่ *A. aceti* subsp. *orleanensis* จะให้ผลเป็นลบ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.) *A. pasteurianus* แบ่งออกเป็น *A. pasteurianus* subsp. *pasteurianus*, *A. pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *A. pasteurianus* subsp. *estunensis*, *A. pasteurianus* subsp. *ascendens* และ *A. pasteurianus* subsp. *paradoxus*

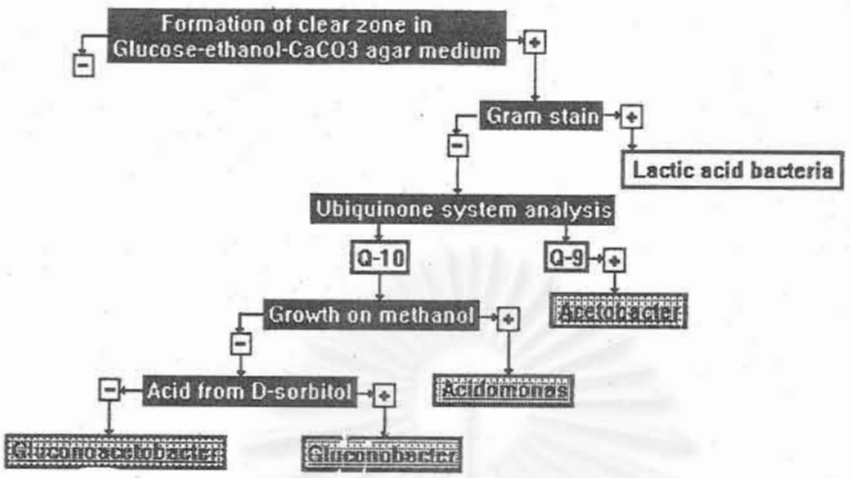
3.) "*A. peroxydans*" 4.) "*A. polyoxogenes*" และ 5.) "*A. methanolicus*"

เชื้อ *Gluconoacetobacter* มีระบบยูบิควิโนนชนิด Q-10 และไม่สามารถใช้แหล่งอาหารที่มีเมธานอลหรือดี-ซอร์บิทอลเป็นองค์ประกอบ (Yamada และคณะ, 1997) เชื้อสกุล *Gluconoacetobacter* นี้แบ่งได้เป็น 5 สปีชีส์ คือ 1.) *Ga. europaeus*, 2.) *Ga. xylinus*, 3.) *Ga. hansenii*, 4.) *Ga. liquefaciens* และ 5.) *Ga. diazotrophicus*

เชื้อ *Gluconobacter* มีระบบยูบิควิโนนชนิด Q-10 ไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตทแต่สามารถผลิตกรดจากซอร์บิทอลและแมนนิทอล (Yamada และคณะ, 1997) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตกรดกลูโคนิคจากกลูโคส (Asai, 1968) เชื้อนี้เจริญได้ไม่ดีในอาหารที่มีเอธานอลเป็นองค์ประกอบ Watanabe และคณะ (1982) รายงานว่าบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารต้านจุลชีพได้ *Gluconobacter* แบ่งได้เป็น *G. oxydans*, *G. cerinus*, *G. frateurii* และ *G. asaii* (Swings, 1992)

เชื้อ *Acidomonas* มีระบบยูบิควิโนนชนิด Q-10 และสามารถเจริญในอาหารที่มีเมธานอลเป็นองค์ประกอบได้ แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มี ดี-ซอร์บิทอลและดี-แมนนิทอลเป็นองค์ประกอบ (Yamada และคณะ, 1997) สามารถแยกเชื้อนี้ได้จากกระบวนการหมักยีสต์ (Uhlig และคณะ, 1986)

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติก Yamada และคณะ (1997) ได้แบ่งแบคทีเรียกรดอะซิติก ในระดับสกุลของเชื้อจากผลการวิเคราะห์ระบบยูบิควิโนน ถ้าสายพันธุ์ใดเป็นชนิดที่มี isoprene unit 9 unit (Q-9) จัดเป็นสกุล *Acetobacter* ถ้าเป็นชนิด Q-10 จะดูผลการเจริญและผลิตกรดในอาหารที่มีเมธานอลเป็นองค์ประกอบ เชื้อที่ให้ผลบวกจัดอยู่ในสกุล *Acidomonas* ถ้าให้ผลลบจะดูผลการเจริญและผลิตกรดในอาหารที่มี ดี-ซอร์บิทอล เป็นองค์ประกอบ ถ้าให้ผลบวกจัดเชื้อนั้นอยู่ในสกุล *Gluconobacter* แต่ถ้าให้ ผลลบจะจัดอยู่ในสกุล *Gluconoacetobacter* ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ลักษณะความแตกต่างของสกุลของแบคทีเรียกรดอะซิติก

ที่มา : Yamada และคณะ, 1997.

การแบ่งแยกแบคทีเรียกรดอะซิติกระดับสปีชีส์สามารถแบ่งแยกได้โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ คือ สกุล *Acetobacter* นั้นเชื้อ *A. Aceti* และ *A. pasteurianus* ให้ผลการทดสอบการสร้างสารอะซิติล เมทธิล คาร์บินอล (Acetyl methyl carbinol) หรือ (VP-test) แตกต่างกัน คือ *A. aceti* ให้ผลลบแต่ *A. pasteurianus* ให้ผลบวก (Uhlig และคณะ, 1986) เชื้อ *Gluconoacetobacter liquefaciens* และ *Ga. diazotrophicus* สามารถผลิตสีน้ำตาล แต่จะแยกความแตกต่างระหว่าง 2 สปีชีส์นี้จากผลการสร้างกรด 5-คีโตกลูโคนิค การเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 30% นอกจากนี้ *Gluconoacetobacter diazotrophicus* สามารถตรึงไนโตรเจนได้ รวมทั้งสามารถเจริญในอาหารที่มีกรดอะซิติกสูงถึง 10% และเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 2.5 สำหรับ *Gluconoacetobacter xylinus* นั้นสามารถผลิตเซลลูโลสและเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้เชื้อกลุ่มนี้ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ (Pigment) สำหรับเชื้อ *Gluconobacter oxydans*, *G. cerinus* และ *G. asaii* มีความแตกต่างจากกันเมื่อเจริญในอาหารที่มีไรบิทอล อะราบิทอล และกรดนิโคตินิค ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ลักษณะความแตกต่างระหว่างเชื้อ *G. oxydans*, *G. cerinus* และ *G. asaii*

เชื้อ *Gluconobacter*	Growth on ribitol	Growth on arabitol	Growth without Nicotinic acid
G. oxydans	+	+	+
G. cerinus	-	-	-
G. asaii	-	-	+

ที่มา : Swings, 1992.

เป็นเส้นใยขนาดเล็ก (Microfibril) ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ในภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ (Colvin and Beer, 1960) มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตเซลลูโลส ในปี พ.ศ. 2531 สมศรี ลีปิพัฒนวิทย์ ได้หาสูตรอาหารที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว โดยใช้เชื้อ "*Acetobacter xylinum*" TISTR 86 Jesus (1971) ได้ศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้จาก ผักผลไม้ และน้ำส้มสายชู และพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* ต่อมา Colvin และคณะ (1977) ได้พบสารโพลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้จากเชื้อ "*Acetobacter xylinum*" ซึ่งประกอบด้วยสายกลูโคสเป็นเส้นตรงและมีกิ่งที่ต่อด้วยพันธะ β-1→4 ตรงคาร์บอนตำแหน่ง ที่ 2 ของกลูโคสสายตรง Valla และ Kjosbakken (1981) ได้พบ "*Acetobacter xylinum*" สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดใหม่ ซึ่งโครงสร้างที่ประกอบด้วย กลูโคส : แมนโนส : แรมโนส : กรดกลูโคนิค ในอัตราส่วน 3:1:1:1 โดยประมาณ Minakami และคณะ (1984) ได้พบเชื้อที่สามารถสร้างโพลีแซคคาไรด์ชนิดใหม่ซึ่งแยกได้จากกากน้ำส้มสายชู พบว่าเป็นสกุล *Acetobacter* โพลีแซคคาไรด์ที่ได้ประกอบด้วย กลูโคส : กาแลคโตส : แมนโนส : กรดกลูคูโรนิค (Glucuronic acid) ในอัตราส่วน 6:2:1:1 โดยปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโพลีแซคคาไรด์นั้นขึ้นอยู่กับน้ำตาลที่ใช้เลี้ยงเชื้อด้วย Gossele และ Swings (1985) ได้พิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อบางสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้พบว่าเป็นเชื้อ "*Acetobacter hansenii*" นอกจากนี้ Amemura และคณะ (1985) พบการสร้างกลูแคน (Glucan) อยู่ปริมาณ 2-25 มก. ต่อ 100 มล. จากเชื้อ "*Acetobacter xylinum*" IFO 3288, IFO 13693 และ IFO 13772, *Acetobacter aceti* IFO 3281 และ 3283, *A. pasteurianus* IFO 3223 และ "*A. rancens*" IFO 3297 และยังพบว่า "*Acetobacter xylinum*" สามารถสร้างโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย ดี-กลูโคส : ดี-แมนโนส : แอล-แรมโนส : กรดกลูคูโรนิค ในอัตราส่วน 7:8:1:2 Savidge และ Colvin (1985) ได้ศึกษาการผลิตเซลลูโลสและโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้จาก "*Acetobacter xylinum*" ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส : แรมโนส : แมนโนส : กรดกลูคูโรนิค ในอัตราส่วน 6:1:1:1 ส่วน Tayama และคณะ (1985) ได้พบโพลีคาไรด์จากเชื้อ "*Acetobacter xylinum*" ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส : แรมโนส : แมนโนส : กรดกลูคูนิค : ออร์โท-อะซิติล (O-acetyl) ในอัตราส่วน 4:1:1:1:1 Masaoka และคณะ (1993) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจาก "*Acetobacter xylinum*" และพบว่าพื้นผิวที่สัมผัสกับอากาศมีผลต่อการผลิตเซลลูโลสซึ่งถ้ายิ่งมีพื้นที่ผิวมากก็จะทำให้การผลิตเซลลูโลสเป็นไปได้มาก Toyasaki และคณะ (1995) ได้ทำการแยกเชื้อจากผลไม้ชนิดต่างๆ เพื่อหาสายพันธุ์ที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงในภาวะเขย่า พบสายพันธุ์ BPR 2001 ซึ่งยังไม่ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงถึง 7.7 กรัมต่อลิตร ใน Jar fermentor Kouda และคณะ (1997) ได้ศึกษาผลของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตเซลลูโลส

การใช้ประโยชน์ของเซลลูโลสจากแบคทีเรียกรดอะซิติกในทางอาหาร เช่น Nata de coco นั้นควรมีเนื้อสัมผัสที่ดีเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งคำว่า Nata de coco ที่ใช้เรียกชื่อวุ้นน้ำมะพร้าวนั้น เป็นคำในภาษาสเปนหมายถึงแผ่นเซลลูโลสหนาสีขาวหรือสีครีมมาจากมะพร้าวและประโยชน์ทาง

อุตสาหกรรมผลิตเซลลูโลส เช่นการทำเยื่อกระดาษเป็นต้น ซึ่งเซลลูโลสจากจุลินทรีย์มีข้อดีด้วยกันหลายประการเช่นมีความบริสุทธิ์สูงและยังช่วยลดการใช้ไม้ลง เป็นการช่วยลดมลพิษทางอ้อมจากการที่จะเกิดน้ำเสียที่ได้ในขั้นตอนการทำไม้ให้เป็นเยื่อกระดาษ

ในประเทศไทยมีการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกมานาน แต่ไม่มีผู้ใดศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อกลุ่มนี้ในระดับ DNA และเนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่ในแถบร้อน (Tropical) มีผลไม้หลายชนิดซึ่งแตกต่างจากประเทศอื่น การวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นถึงการศึกษาเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้ทั้งที่มีความสามารถผลิตกรดอะซิติก และกรดกลูโคนิคปริมาณสูงและทนความร้อน รวมทั้งการผลิตเซลลูโลสได้ดี และศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อโดยอาศัยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ระบบยูบิควิโนน และ DNA-DNA homology รวมทั้งศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะซิติกและเซลลูโลส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

ตู้ลามินาโฟลว์ (Laminar flow) รุ่น BV-126 ของบริษัท International Scientific Supply, Thailand.

เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง รุ่น 43 ของบริษัท Beckman, USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) รุ่น SCR 20 B ของบริษัท Hitachi, Japan.

กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHS ของบริษัท Olympus Optical, Japan.

หม้ออบไอน้ำฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น HA-3D ของบริษัท Hirayama, Japan.

ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ –20 °ซ. รุ่น A ของบริษัท Kelvinator, SAUD.

กระดาษกรอง (Filter paper) ชนิด qualitative ของบริษัท Toyo Roshi Kaisha, Japan.

Cellulose TLC plastic sheet Art. 5577 ของบริษัท Merck, Germany.

Siliga gel TLC glass plate ชนิด 60 F 254 ของบริษัท Merck, Germany.

คิวเวท (Cuvet) ชนิด S-10SM ของบริษัท Sigma, USA.

สไลด์ (Slide) ขนาด 2.5x7.5 cm. ยี่ห้อ sail, China.

แผ่นแก้วปิดสไลด์ (Cover glass) ของบริษัท Deckglaser, Germany.

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Thelco 84 ของบริษัท Precision Scientific, USA.

เครื่องผสมสาร (Vortex mixture) รุ่น K-550-GE ของบริษัท Scientific Industries, USA.

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 5 ตำแหน่ง รุ่น 1062 MP8-1 ของบริษัท Sartorius, Germany.

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น 518 ของบริษัท Sartorius, Germany.

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BA610 ของบริษัท Sartorius, Germany.

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น Thelco 6 ของบริษัท Precision Scientific, USA.

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น B-60 และ UM 100 ของบริษัท Memmert, Germany.

หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-light lamp) รุ่น TL-900/U ของบริษัท Lamag, Switzerland.

เครื่องเขย่าแบบหมุน (Rotary shaker) รุ่น S101 ของบริษัท Firstek Scientific.

เครื่องเขย่าแบบหมุนควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated incubator shaker) รุ่น INNOVA 4230 และ Giogyrotory Shaker ของบริษัท Brunswick Scientific, USA.

ตู้อบฆ่าเชื้อลมร้อน (Hot air oven) รุ่น T5090E ของบริษัท Haraeus, Germany

เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (Texture analyzer) รุ่น A128 ของบริษัท LLOYD, England.

Micropipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.

Micropipette ขนาด 200 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France.

Microplate reader รุ่น 3550 ของบริษัท BIO-RAD, USA.

เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer) รุ่น Dura-dry ของบริษัท FTS Systems Inc, USA.

3.1.2 <u>เคมีภัณฑ์</u>

โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) ของบริษัท Merck, Germany.

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ของบริษัท Carlo, USA.

แคลเซียมแลคเตท (Calcium lactate) ของบริษัท BDH Chemical, England.

โบรโมไทมอลบลู (Bromothymol blue) ของบริษัท BDH Chemical, England.

โบรโมคลีซอลเพอร์เพิล (Bromocresol purple) ของบริษัท May and Baker, England.

โปแตสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต (Potassium hydrogen phthalate) ของบริษัท Merck, Germany.

ฟีนอลฟ์ทาลีน (Phenolphthalein) ของบริษัท Merck, Germany.

ไอโดดีนคริสตัล (Iodine crystal) ของบริษัท Carlo Erba, USA.

ซัฟฟรานิน (Safranin) ของบริษัท Fluka, Switzerland.

คริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet) ของบริษัท Ajax, Australia.

อิมเมอร์ชั่นออยล์ (Immersion oil) ของบริษัท Merck, Germany.

เอธานอล (Ethanol) ของบริษัท Clinac, Thailand.

เมธานอล (Methanol) ของบริษัท Merck, Germany.

คลอโรฟอร์ม (Chroloform) ของบริษัท Merck, Germany.

อะซิโตน (Acetone) ของบริษัท Merck, Germany.

เอทธิลอะซิเตท (Ethyl acetate) ของบริษัท Merck, Germany.

โพแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต (Potassium permanganate) ของบริษัท Merck, Germany.

กรดฟอร์มิค (Formic acid) ของบริษัท May and Baker, England.

กรดอะซิติก (Acetic acid) ของบริษัท BDH Chemical, England.

กรดอะซิติก (Acetic acid) ของบริษัท BDH Chemical, England.

กรดไฮโดรคลอริค (Hydrochloric acid) ของบริษัท May and Baker, England.

ออร์โท-ฟีนิลลีนไดอะมีน (O-phenylene diamine) ของบริษัท May and Baker, England.

แอมโมเนียมออกซาเลต (Ammonium oxalate) ของบริษัท Merck, Germany.

โพแตสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide) ของบริษัท May and Baker, England.

เบสิคฟุคซิน (Basic fuchsin) ของบริษัท BDH Chemical, England.

แอซิดฟุคซิน (Acid fuchsin) ของบริษัท Judex, England.

กรดแทนนิค (Tannic acid) ของบริษัท Ajax, Australia.

อลูมิเนียมแอมโมเนียมซัลเฟต (Aluminium ammonium sulfate) ของบริษัท May and Baker, England.

ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

ไดแอมโนเนียมซัลเฟต (Diammonium sulfate) ของบริษัท Baker, Holland.

ไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate) ของบริษัท Merck, Germany.

โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate) ของบริษัท Merck, Germany.

แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Ammonium dihydrogen phosphate) ของบริษัท May and Baker, England.

แมกนีเซียมซัสเฟต (Magnesium sulphate) ของบริษัท May and Baker, England.

เฟอร์ริคคลอไรด์ (Ferric chloride) ของบริษัท May and Baker, England.

โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide) ของบริษัท Merck, Germany.

โปแตสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride) ของบริษัท Fluka Garantie, Germany.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ของบริษัท Merck, Germany.

ไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ (Hydroxylamine hydrochloride) ของบริษัท Merck, Germany.

แอลฟาแนพทอล (α-Naphtol)ของบริษัท Merck, Germany.

คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulphate) ของบริษัท Merck, Germany.

โซเดียมโปแตสเซียมทาเทรต (Sodium potassium tatrate) ของบริษัท Merck, Germany.

โตรโซเดียม ซิเตรท (Trisodium citrate) ของบริษัท Merch, Germany.

ฟอร์มาไมด์ (Formamide) ของบริษัท Carlo Erba, USA.

N, N-ไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (N, N-Dimethylformamide) ของบริษัท Ajax, Australia.

กรดซิตริก (Citric acid) ของบริษัท Merck, Germany.

สเตร็ปตาวิดิน เปอร์ออกซิเดส (Streptavidine peroxidase) ของบริษัท Boehringer Mannheim, Germany.

โฟโตโพรบ ไบโอติน เอสพี-100 (Photoprobe biotin sp-100) ของบริษัท Vector, USA.

บิวทานอล (n-Butanol) ของบริษัท Merck, Germany.

โบวิน ซีรัม อัลบูมิน เอ็ฟวี (Bovine serum albumin FV) ของบริษัท Boehringer Mannheim, Germany.

แซลมอน ดีเอ็นเอ (Salmon DNA) ของบริษัท Sigma, Germany.

เด็กแตรน ซัลเฟต (Dextran sulfate) ของบริษัท Merck, Germany.

โพลีไวนิล ไพโรลิโดน (Polyvinyl pyrolidone) ของบริษัท Sigma, Germany.

ทริตอน เอ็กซ์-100 (Triton X-100) ของบริษัท Sigma, Germany.

อาร์เอ็นเอส ทีวัน (RNase T_1) ของบริษัท Boehringer Mannheim, Germany.

โปรตีเนส เค (Proteinase K) ของบริษัท Boehringer Mannheim, Germany.

ฟีคอล 400 (Ficoll 400) ของบริษัท Sigma, Germany.

คาล์ฟ ไทมัส ดีเอ็นเอ (Calf thymus DNA) ของบริษัท Boehringer Mannheim, Germany.

3.1.3 <u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

กรดคาซามิโน (Casamino acid) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

โปแตสเซียมกลูโคเนต (Potassium gluconate) ของบริษัท BDH Chemical, England.

กรดกลูตามิค (Glutamic acid) ของบริษัท Sigma, USA.

แบคโตอาการ์ (Bacto agar) ของบริษัท Merck, Germany.

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Oxoid, England.

แบคโตเปปโตน (Bacto peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate) ของบริษัท Vidyhasom, Thailand.

แอล-อะราบิโนส (L-Arabinose) ของบริษัท Merck, Germany.

ดี-ฟรุคโตส (D-Fructose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.

ดี-กาแลคโตส (D-Galactose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.

กลีเซอรอล (Glycerol) ของบริษัท Univar, Australia.

ดี-แมนโนส (D-Mannose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.

ดี-แมนนิทอล (D-Mannitol) ของบริษัท Merck, Germany.

ซูโครส (Sucrose) ของบริษัท Merck, Germany.

ดี-เซลลิไบโอส (D-Cellobiose) ของบริษัท Sigma, USA.

แป้ง (Starch) ของบริษัท Merck, Germany.

ดี-ไซโลส (D-Xylose) ของบริษัท Merck, Germany.
มอลโตส (Maltose) ของบริษัท Sigma, USA.
ดี-เมเลซิโตส (D-Melezitose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.
เมลิไบโอส (Melibiose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.
แอล-ราฟฟีโนส (L-Raffinose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.
เอสคูลิน (Esculin) ของบริษัท Sigma, USA.
ดี-ไรโบส (D-Ribose) ของบริษัท Sigma, USA.
ซาลิซิน (Salicin) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
แอล-แลมโนส (L-Rhamnose) ของบริษัท Sigma, USA.
แอล-ซอร์โบส (L-Sorbose) ของบริษัท Sigma, USA.
ดี-ทรีฮาโลส (D-Trehalose) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
ซอร์บิทอล (Sorbitol) ของบริษัท BDH Chemical, England.
นมผงขาดมันเนย (Skim milk) ของบริษัท Merck, Germany.

3.1.4 จุลินทรีย์ที่ใช้เปรียบเทียบ

เชื้อที่ใช้เปรียบเทียบได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ได้แก่

Acetobacter aceti subsp. *aceti* TISTR 354^{T} (T = type strain)
A. aceti subsp. *orleanensis* TISTR 753^{T}
A. pasteurianus TISTR 1056^{T}
Gluconoacetobacter hansenii TISTR 1054^{T} (*A. hansenii* TISTR 1054^{T})
Ga. liquefaciens TISTR 1057^{T}(*A. liquefaciens* TISTR 1057^{T})
Ga. xylinus TISTR 893 (*A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 893)
Gluconobacter cerinus TISTR 756^{T}

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกจากแหล่งต่างๆ

3.2.1.1 ทำการแยกเชื้อจากผลไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่ แอปเปิ้ล กล้วยหอม กล้วยน้ำว้า กล้วยไข่ น้อยหน่า น้อยโหน่ง องุ่น ฝรั่ง ขนุน พุทธา มะกรูด ลางสาด ลองกอง ลำไย มะม่วง ส้มเขียวหวาน สับปะรด เสาวรส พีช มะละกอ ชมพู่ เงาะ มะยม ละมุด สตรอเบอรี่ มะเขือเทศ

มะขามหวาน แตงโม แคนตาลูป แตงไทย มังคุด มะเฟือง มะขามเทศ ลิ้นจี่ อ้อย ระกำ และทับทิม รวมทั้งตัวอย่างจากดอกไม้ได้แก่ ดอกเข็มแดง ดอกพุทธรักษา ดอกจำปี ดอกหางนกยูงไทย ดอกชงโค ดอกลั่นทม ดอกแก้ว และดอกบีบ รวมทั้ง น้ำตาลสด ข้าวหมาก ลูกแป้งข้าวหมาก และขนมจีน โดยเก็บตัวอย่างจากตลาดสดทั่วไปในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง วัดปริมาณน้ำตาลของผลไม้แต่ละชนิดในรูปของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid , TSS) ด้วยแฮนด์ รีแฟรกโตมิเตอร์ (Hand refractometer)

3.2.1.2 ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Enriched culture) โดยนำตัวอย่างผลไม้แต่ละชนิดหนักประมาณ 1-2 กรัม จากส่วนที่เป็นผลไม้ได้รอยช้ำหรือเน่าโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ใส่ลงในหลอดขนาด 30 มล. ซึ่งมีอาหารเหลว GEY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.1) หลอดละ 15 มล. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 3 วัน (Asai และคณะ, 1964)

3.2.1.3 แยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารวุ้น โดยแตะเชื้อในหลอดจากข้อ 3.2.1.2 ไป streak ลงบนอาหารอาหาร GEY ซึ่งเติม $CaCO_3$ (ภาคผนวก ก ข้อ 1.2) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 2-3 วัน เชื้อที่สร้างกรดจะสังเกตเห็นโคโลนีเป็นวงใส (Clear zone) นำเชื้อที่แยกได้ไป streak เพื่อให้แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ อีกครั้ง เก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ไว้ในอาหารแข็ง GYPG (ภาคผนวก ก ข้อ 1.3) คัดเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกเพื่อนำมาศึกษาในด้านอื่นๆต่อไป

3.2.2 <u>การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดอะซิติกหรือผลิตเซลลูโลสปริมาณสูง</u>

3.2.2.1 นำเชื้อที่มีอายุ 24 ชม. (ข้อ 3.2.1.3) ทำให้เป็น suspension โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 0.85% แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นม. ให้ได้ค่า O.D. (Optical density) เท่ากับ 0.5 แล้วใช้ suspension ของเชื้อที่ได้ปริมาณ 1% v/v เพาะลงในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) 80 มล. (Asai และคณะ, 1964) ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ให้อากาศโดยใช้เครื่องเขย่าแบบหมุน (Rotary shaker) ที่อัตรา 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นวัดเปอร์เซ็นต์กรดที่ได้ (ภาคผนวก ก ข้อ 2.1) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อที่ผลิตกรดได้สูงมาศึกษาปัจจัยเบื้องต้นที่มีผลต่อการผลิตกรดอะซิติกต่อไป

3.2.2.2 คัดเลือกแบคทีเรียกรดอะซิติกที่ผลิตเซลลูโลส นำ enriched culture (ข้อ 3.2.1.2) ที่ทำการแยกเชื้อในข้อ 3.2.1.3 แล้ว มาบ่มต่อไปที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 14 วัน ถ้าสังเกตเห็นชั้นของวุ้นหรือ เซลลูโลสที่ผิวหน้าอาหาร ให้นำเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ โดยstreak บนอาหารวุ้นสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.6) หลายๆ ครั้ง แล้วจึงเก็บรักษาเชื้อไว้ในหลอดอาหารวุ้น GYPG (ภาคผนวก ก ข้อ

1.3) เพื่อศึกษาต่อไป และอีกส่วนหนึ่งนำโคโลนีเดี่ยวของแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงเพื่อดูความสามารถในการผลิตเซลลูโลสในหลอดขนาด 30 มล. ซึ่งบรรจุอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.7) หลอดละ 15 มล. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูง โดยการใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์วัดความหนาของชั้นเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้

3.2.3 <u>การคัดเลือกเชื้อ *Gluconobacter*</u>

นำเชื้อที่แยกได้ข้อ 3.2.1.3 มาทดสอบการออกซิไดส์อะซิเตท และแลคเตท ตามวิธีของ Asai และคณะ (1964) โดยเชื้อ *Gluconobacter* จะไม่สามารถออกซิไดส์สารประกอบทั้งสอง

การเก็บรักษาเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดทำโดยใช้วิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization)

3.2.4 <u>การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ</u>

นำเชื้อแบคทีเรียตัวแทนที่คัดเลือกได้ศึกษาลักษณะต่างๆ ดังนี้

3.2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญและสรีรวิทยา

- ตรวจสอบลักษณะเซลล์โดยการย้อมสีแกรม (ภาคผนวก ก ข้อ 2.2) ; (Hucker และ Cohn, 1923) และย้อมสีแฟลกเจลลา และการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า และตรวจสอบลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ (ภาคผนวก ก ข้อ 1.2) หลังจากบ่มที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม.

- ทดสอบการสร้างสีน้ำตาล โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้น GYC บ่มไว้ที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.19) ผลบวกคือ จะทำให้อาหารที่ใช้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ถ้าไม่สร้างสีน้ำตาลแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Asai และคณะ, 1964)

- ทดสอบการเจริญบนอาหารกรดกลูตามิค (Glutamic acid) ของเชื้อโดยนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารวุ้น GG บ่มไว้ที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.20) ผลบวกคือ เชื้อสามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้ ถ้าไม่เจริญแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Asai และคณะ, 1964)

- ทดสอบการเจริญในอาหารวุ้นโฮเยอร์-เฟรเทอร์ (Hoyer-Frateur agar) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้น Hoyer-Frateur บ่มไว้ที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.21) ผลบวกคือ เชื้อสามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้ ถ้าไม่เจริญแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Asai, 1968) (ภาคผนวก ก ข้อ 2.3) ; (Forbes, 1981)

- ทดสอบการเจริญที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 7.5 และ 8.0 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. ในอาหารเหลว GYPG (ภาคผนวก ก ข้อ 1.4) และการเจริญที่อุณหภูมิ 37 และ 40 °ซ. บนอาหารแข็ง GYPG (ภาคผนวก ก ข้อ 1.3) (Asai และคณะ, 1964)

- ทดสอบความสามารถในการทนกรดอะซิติกที่ระดับความเข้มข้น 3.0% v/v ในอาหารเหลว GGYPA (ภาคผนวก ก ข้อ 1.8) โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 °ซ. เป็นเวลา 72 ชม. และทดสอบความสามารถในการทนเอธานอลที่ระดับความเข้มข้น 8.0% v/v ในอาหารเหลว GGYPE (ภาคผนวก ก ข้อ 1.9) โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม. (Theeragool และคณะ, 1997)

3.2.4.2 ลักษณะทางชีวเคมี

- การสร้างเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test) โดยการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 3% ปริมาณ 1-2 หยดลงบนโคโลนีของเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น GYPG เป็นเวลา 24 ชม. ที่ 30 °ซ. (ภาคผนวก ก ข้อ 1.3) หากเกิดฟองแก๊สแสดงว่าให้ผลเป็นบวก คือเชื้อนั้นสามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้ ถ้าไม่มีฟองแก๊สแสดงว่าผลเป็นลบ (ภาคผนวก ก ข้อ 2.4) ; (Cowan, 1993)

- การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอะซิเตท (Oxidation of acetate) เป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว SBYP แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน(ภาคผนวก ก ข้อ 1.10) หากอินดิเคเตอร์ของอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าให้ผลเป็นบวกหรือเบสิค (Basic) แต่ถ้าอินดิเคเตอร์ไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าให้ผลเป็นลบหรือแอซิด (Acid) (Asai และคณะ, 1964)

- ทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของแลคเตท (Oxidation of lactate) ไปเป็นคาร์บอเนต (Carbonate) เชื้อที่ให้ผลเป็นบวกบนอาหารวุ้น CY บ่มไว้ที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.11) จะเกิดลักษณะขาวขุ่นของแคลเซียมคาร์บอเนตรอบโคโลนี แต่ถ้าไม่เปลี่ยนแปลงแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Asai และคณะ, 1964)

- ทดสอบการสร้างกรดกลูโคนิค (ภาคผนวก ก ข้อ 2.4)โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว GY บ่มไว้ที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.12) ภายหลังจากการทดสอบ ถ้าให้สีน้ำตาลเข้มจะให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าเปลี่ยนเป็นสีชาจะให้ผลเป็นลบ (Gossele และคณะ, 1980)

- ทดสอบการสร้างกรดคีโตกลูโคนิค นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว YG แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.13) จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge) เพื่อแยกเซลล์ออก นำส่วนของเหลว (Supernatant) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มา spot บนแผ่น Thin layer chromatography (TLC) ชนิดเซลลูโลส แล้วผ่านขั้นตอนทางโครมาโตรกราฟี (ภาคผนวก ก ข้อ 2.6) ภายหลังทำให้เกิดปฏิกิริยาสามารถตรวจสอบได้ว่าเป็นกรดคีโตกลูโคนิคชนิดใด โดยเทียบกับผลตามที่ Gossele และคณะ (1980) ได้รายงานไว้ (ภาคผนวก ก ข้อ 2.6)

- ทดสอบการใช้แมนนิทอล โดยนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารวุ้น MYP และ MGYP แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.14 และ 1.15) เชื้อที่สามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้ จะให้ผลบวก ถ้าไม่เจริญแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Asai และคณะ, 1964)

- ทดสอบการสร้างสาร ไดไฮดรอกซีอะซิโตน (Dihydroxyacetone) จากกลีเซอรอล โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้น GGY ไปบ่มไว้ที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ ลาย เฟห์ลิ่ง (Fehling's solution) (ภาคผนวก ก ข้อ 2.7) ลงบนโคโลนีแล้วหากเกิดสี งว่า ให้ผลบวก ถ้าไม่เปลี่ยนแปลงแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Asai และคณะ, 1964)

- การสร้างอะซิติล เมทธิล คาร์บินอล (Acetyl methyl carbinol) จากแคลเซียมแลคเตท โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CY บ่มไว้ที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.17) เมื่อทดสอบตามภาคผนวก ก ข้อ 2.8 จะให้สีชมพูถึงแดงแสดงว่าให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแสดงว่าให้ผล เป็นลบ (Gossele และคณะ, 1983)

- ความสามารถในการสร้างกรดจาก ดี-กลูโคส (D-Glucose) แอล-อะราบิโนส (L-Arabinose) ดี-ฟรุกโตส (D-Fructose) ดี-กาแลคโตส (D-Galactose) แมนนิทอล (Mannitol) ดี-แมนโนส (D-Mannose) กลีเซอรอล (Glycerol) ซูโครส (Sucrose) มอลโตส (Maltose) ดี-ซอร์บิทอล (D-Sorbitol) เมลิไบโอส (Melibiose) ดี-เซลโลไบโอส (D-Cellobiose) แป้ง (Strarch) ดี-ไซโลส (D-Xylose) มอลโตส (Maltose) ดี-เมเลไซโตส (D-Melezitose) แอล-ราฟฟิโนส (L-Raffinose) เอสคูลิน (Esculin) ดี-ไรโบส (D-Ribose) ซาลิซิน (Salicin) แอล-แรมโนส (L-Rhamnose) แอล-ซอร์โบส (L-Sorbose) ดี-ทรีฮาโลส (D-Trehalose) เอธานอล (Ethanol) เมธานอล (Methanol) ซอร์บิทอล (Sorbitol) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CBY บ่มไว้ที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.18) ถ้าเชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนนั้นๆได้จะมีการผลิตกรดออกมาทำให้เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นเหลือง แสดงว่าให้ผลเป็นบวก ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนนั้นๆ ก็จะไม่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ (Asai และคณะ, 1964)

3.2.5 การศึกษาระบบยูบิควิโนน (Ubiquinone system)

นำเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกตัวแทนแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว GEPY 4 มล. (ภาคผนวก ก ข้อ 1.22) ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 30 มล. บ่มไว้ที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 2 วัน ไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อีกในอาหารเหลว GG ปริมาตร 200 มล. (ภาคผนวก ก ข้อ 1.23) บรรจุในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำเซลล์ของเชื้อหลังจากเซนตริฟิวจ์แยกออกจากอาหารเหลวไปวิเคราะห์ระบบยูบิควิโนน (ภาคผนวก ก ข้อ 2.9) โดยสกัดสารยูบิควิโนนด้วยคลอโรฟอร์ม : เมธานอล = 2:1 และแยกโดยวิธีทางโครมาโตกราฟี เปรียบเทียบค่า R_f ของสารยูบิควิโนนที่สกัดได้กับสารมาตรฐาน (Yamada และคณะ, 1968)

3.2.6 การศึกษา DNA-DNA hybridization

3.2.6.1 การสกัด DNA และทำให้บริสุทธิ์

สกัด DNA จากเซลล์ของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว GEYP (ภาคผนวก ก ข้อ 1.22) โดยบ่มไว้บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่อัตรา 200 รอบต่อนาที ที่ 30°ซ. เป็นเวลา 12-24 ชม. ทำให้ DNA บริสุทธิ์โดยใช้ ฟีนอล (1) : คลอโรฟอร์ม (1) แล้วทำลาย RNA และโปรตีนด้วยเอนไซม์ RNase A, RNase T_1 และ Protenase K ตามวิธีการของ Tamaoka, 1994. (ภาคผนวก ก ข้อ 2.10)

3.2.6.2 การทำ DNA-DNA hybridization

นำ DNA ของเชื้อทดสอบและ DNA ของเชื้อมาตรฐานมาตรึง (Immobilized) ลงใน Microdilution wells แล้ว hybridize ด้วย DNA probe ของ type strain ซึ่งติดฉลาก (Labeled) ด้วยสารละลาย Photobiotin ตามวิธีการของ Ezaki และคณะ (1989) และ Tanasupawat และคณะ (1992) ตรวจสอบผล hybridization โดยการวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้น (Colorimetric method) จากปฏิกิริยาด้วย Microplate reader ที่ 450 นม. แล้ว คำนวนเปอร์เซ็นต์ Homology (ภาคผนวก ก ข้อ 2.10)

3.2.7 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะซิติก

นำเชื้อตัวแทนที่สามารถผลิตกรดอะซิติกปริมาณสูงที่คัดเลือกได้ (ข้อ 3.2.2.1) 5 สายพันธุ์ และสายพันธุ์มาตรฐาน (Type strain) 1 สายพันธุ์ คือ *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^{T} ซึ่งเลี้ยงไว้ในหลอดอาหารวุ้น GYPG (ภาคผนวก ก ข้อ 1.3) ที่มีอายุ 24 ชม. มาศึกษาปัจจัยเบื้องต้นที่มีผลต่อการผลิตกรดตามลำดับดังนี้

3.2.7.1 ศึกษาปริมาณเอธานอลเริ่มต้นที่เหมาะสม

นำเชื้อตัวแทนที่คัดเลือกไว้ทั้ง 6 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ปริมาตร 80 มล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่แปรปริมาณเอธานอลเข้มข้น 95% ในอาหารเป็น 0, 2, 4, 6 และ 8 % v/v ใช้ Suspension ของเชื้อปริมาณ 1% v/v เพาะลงในอาหาร EY แล้วนำฟลาสก์ที่บรรจุอาหารไปทำการหมักในเครื่องเขย่าแบบหมุน (Rotary shaker) ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 3 วัน สุ่มตัวอย่างน้ำหมัก 10 มล. ทุกวัน เพื่อวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์กรดที่เชื้อสร้างได้โดยวิธีไตเตรท (Titration method) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล (ภาคผนวก ก ข้อ 2.1) โดยจะใช้ค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่ผลิตได้ในวันที่ 3 ของการหมักเป็นเกณฑ์ในการตัดสินว่าจะเลือกการเติมเอธานอลที่ระดับใด เพื่อศึกษาการปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดในข้อต่อไป โดยวางแผนการทดลองด้วย Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (ดงเดช ลีโทชวลิตร, 2540)

3.2.7.2 ศึกษาปริมาณกรดอะซิติกที่เหมาะสม

ภายหลังจากได้ปริมาณเอธานอลที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.7.1 แล้ว นำเชื้อทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ทั้ง 6 สายพันธุ์มาศึกษาปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด โดยเตรียมอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ที่เติมเอธานอลในปริมาณที่เหมาะสมจากการคัดเลือกใน ข้อ 3.2.7.1 แล้วแปรปริมาณ กรดอะซิติก เข้มข้น 99.8% (Glacial acetic acid) เป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 % v/v ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.7.1 โดยสุ่มตัวอย่างน้ำหมัก 10 มล. ทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์กรดที่สร้างได้โดยวิธีไตเตรท (Titration method) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยจะใช้ค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่ผลิตได้ในวันที่ 3 ของการหมักเป็นเกณฑ์ในการตัดสินว่าจะเลือกการเติมกรดอะซิติกที่ระดับใด เพื่อศึกษาการปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดในข้อต่อไป โดยวางแผนการทดลองด้วย Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (ดงเดช ลีโทชวลิตร, 2540)

3.2.7.3 ศึกษาปริมาณกรดคาซามิโนที่เหมาะสม

ภายหลังจากได้ปริมาณเอธานอลและกรดอะซิติกที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.7.1-3.2.7.2 แล้ว นำเชื้อทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ทั้ง 6 สายพันธุ์ มาศึกษาปริมาณกรดคาซามิโน (Casamino acid) เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด โดยเตรียมอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ที่เติมเอธานอลและกรดอะซิติกในปริมาณที่เหมาะสมภายหลังจากการศึกษา ข้อ 3.2.7.1-3.2.7.2 แล้วแปรปริมาณกรดคาซามิโนเป็น 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1% w/v ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.7.1-3.2.7.2 โดยสุ่มตัวอย่างน้ำหมัก 10 มล. ทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์กรดที่สร้างได้โดยวิธีไตเตรท (Titration method) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยจะใช้ค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่ผลิตได้ในวันที่ 3 ของการหมักเป็นเกณฑ์ในการตัดสินว่าจะเลือกการเติมกรดคาซามิโนที่ระดับใด เพื่อศึกษาการปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดในข้อต่อไป โดยวางแผนการทดลองด้วย Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (ดงเดช ลีโทชวลิตร, 2540)

3.2.7.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมัก

ภายหลังจากได้ปริมาณเอธานอล กรดอะซิติก และกรดคาซามิโนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.7.1-3.2.7.3 แล้ว นำเชื้อทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ รวมทั้งเชื้อ *Acetobacter pasteurianus* TISTR 1056^{T} ในขั้นตอนนี้จึงมีเชื้อที่นำมาศึกษาทั้งหมด 7 สายพันธุ์ นำเชื้อมาศึกษาโดยเลี้ยงในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ที่เติมเอธานอล กรดอะซิติก และกรดคาซามิโน ในปริมาณที่เหมาะสมภายหลังจากการศึกษา ข้อ 7.1-7.3 แล้วแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักเป็น 30, 37 และ 40 °ซ. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.7.1-3.2.7.3 โดยสุ่มตัวอย่างน้ำหมัก 10 มล. ทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์กรดที่สร้างได้โดยวิธีไตเตรท (Titration method) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยจะใช้ค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่ผลิตได้ในวันที่ 3 ของการหมักเป็นเกณฑ์ในการศึกษาว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตกรดได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกันอย่างไร โดยวางแผนการทดลองด้วย Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (ดงเดช ลีโทชวลิตร, 2540)

3.2.8 <u>ศึกษาปริมาณการผลิตเซลลูโลส</u>

นำเชื้อตัวแทนที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูงจำนวน 6 สายพันธุ์ รวมทั้งสายพันธุ์ *Gluconoacetobacter xylinus* TISTR 893 มาศึกษาการผลิตเซลลูโลสและเปรียบเทียบผลในด้านต่างๆ ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.7) โดยปรับค่า TSS ของน้ำมะพร้าวเริ่มต้นให้เป็น 5 °B ด้วยเครื่องแฮนด์รีแฟรกโตมิเตอร์แล้วถ่ายเชื้อ 1 ลูป ลงไปในอาหารดังกล่าว ภายในหลอดทดลองขนาด 30 มล.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วันแล้วนำเฉพาะชั้นเซลลูโลสที่เชื้อสร้างขึ้น ไปเพาะลงในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว 400 มล. ที่บรรจุในภาชนะปากกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 10.7 ซม. ตรวจสอบผลโดยวัดความหนาของชั้นเซลลูโลสที่เชื้อแต่ละสายพันธุ์ผลิตได้ในวันที่ 3, 6, 9, 12 และ 14 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. โดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบชั้นเซลลูโลสที่ผลิตได้ในวันที่ 14 ของการหมักจากแต่ละสายพันธุ์ในด้าน น้ำหนักเปียก (กรัม) น้ำหนักแห้ง (กรัม) ค่าเนื้อสัมผัสจากเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (Texture analyzer) ในรูปของแรงเจาะทะลุผ่าน (Penetration force) โดยใช้หัวเข็มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เป็นหน่วยนิวตัน (N.) โดยวางแผนการทดลองด้วย Completely Randomized Design (CRD) (คงเดช ลีโทชวลิตร, 2540)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกจากแหล่งต่างๆ

ได้เชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกทั้งหมด 216 สายพันธุ์ จากผลไม้ต่างๆ 37 ชนิด จากดอกไม้ชนิดต่างๆ 8 ชนิด รวมทั้งวัสดุอื่นๆอีก 4 ชนิด ซึ่งเก็บตัวอย่างจาก ตลาดสดในกรุงเทพฯ ปทุมธานี นนทบุรี สระบุรี เพชรบุรี และราชบุรี พบว่าผลการวัดปริมาณน้ำตาลในรูปของสารที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4.1-33.5 °B. จากการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกทุกสายพันธุ์ย้อมสีแกรมลบสร้างเอนไซม์แคตาเลส และกรดอะซิติกจากเอธานอล ส่วนใหญ่ออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตทได้ แต่ไม่ก่อให้เกิดคีโตเจนนิซิส (Ketogenesis) จากกลีเซอรอล บางสายพันธุ์สร้างวุ้นได้ และบางสายพันธุ์เจริญได้ที่อุณหภูมิ 37-40 °ซ. (ตารางที่ 4.1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 วันเดือนปีที่แยก ชนิดของวัสดุที่ใช้แยก แหล่งที่มา รหัสของเชื้อ และคุณสมบัติบางประการของเชื้อ

Date	Source/TSS	Place	Strain number	Gram reaction	Catalase test	Oxidation of acetate	Oxidation of lactate	Ketogenesis from glycerol	Acid production in 3 days (%)	Growth at (37/40°C)	Cellulose production in 14 days (mm.)
10-Sep-97	เงาะ	กรุงเทพฯ	1.RB1-1	-	+	Basic	+	-	0.012	(+/-)	-
	(Rambutan)/14.5°B	(สามย่าน)	2.RB1-2	-	+	Basic	+	-	0.012	(+/-)	-
			3.RB2-1	-	+	Basic	+	-	0.030	(+/-)	-
			4.RB2-2	-	+	Basic	+	-	1.154	(+/W)	-
			5.RB3-1	-	+	Basic	+	-	0.763	(+/-)	-
			6.RB3-2	-	+	Basic	+	-	0.908	(+/-)	-
10-Sep-97	ลำไย	กรุงเทพฯ	7.LG4-1	-	+	Basic	+	-	0.009	(+/-)	-
	(Longan fruit)/14.7°B	(สามย่าน)	8.LG4-2	-	+	Basic	+	-	0.294	(+/-)	-
			9.LG5-1	-	+	Basic	+	-	0.030	(+/-)	-
			10.LG5-2	-	+	Basic	+	-	0.006	(+/-)	-
			11.LG6-1	-	+	Basic	+	-	1.106	(+/W)	-
			12.LG6-2	-	+	Basic	+	-	0.799	(+/-)	-
30-Oct-97	มะเขือเทศ	กรุงเทพฯ	13.TM7-1	-	+	Basic	+	-	0.637	(+/-)	-
	(Tomato)/4.4°B	(สามย่าน)	14.TM7-2	-	+	Basic	+	-	0.607	(+/-)	-
			15.TM7-3	-	+	Basic	+	-	0.709	(+/-)	-
			16.TM8-1	-	+	Basic	+	-	0.541	(+/-)	-
			17.TM8-2	-	+	Basic	+	-	0.469	(+/-)	-
			18.TM8-3	-	+	Basic	+	-	0.637	(+/-)	-
30-Oct-97	มะกรูด	กรุงเทพฯ	19.KL13-1	-	+	Basic	+	-	0.421	(+/-)	-
	(Kaffir lime)/4.1°B	(สามย่าน)	20.KL13-2	-	+	Basic	+	-	0.541	(+/-)	-
			21.KL13-3	-	+	Basic	+	-	0.817	(+/-)	-
			22.KL14-1	-	+	Basic	+	-	0.649	(+/W)	-
			23.KL14-2	-	+	Basic	+	-	0.914	(+/-)	-
			24.KL14-3	-	+	Basic	+	-	0.793	(+/-)	-

°B, °Brix ; +, positive ; W, weak positive ; -, negative; NT, not test

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Date	Source/TSS	Place	Strain number	Gram reaction	Catalase test	Oxidation of acetate	Oxidation of lactate	Ketogenesis from glycerol	Acid production in 3 days (%)	Growth at (37/40°C)	Cellulose production in 14 days (mm.)
30-Oct-97	ลางสาด (Langsat)/13.1°B	กรุงเทพฯ (สามย่าน)	25.LS15-1	-	+	Basic	+	-	0.810	(+/-)	-
			26.LS15-2	-	+	Basic	+	-	1.080	(+/-)	-
			27.LS15-3	-	+	Basic	+	-	0.240	(+/W)	-
			28.LS16-1	-	+	Basic	+	-	1.350	(+/-)	-
			29.LS16-2	-	+	Basic	+	-	0.780	(+/-)	-
			30.LS16-3	-	+	Basic	+	-	0.012	(+/-)	-
30-Oct-97	มะเฟือง (Star fruit)/15.0°B	กรุงเทพฯ (ตลิ่งชัน)	31.SF17-1	-	+	Basic	+	-	0.030	(+/-)	-
			32.SF17-2	-	+	Basic	+	-	0.660	(+/-)	-
			33.SF17-3	-	+	Basic	+	-	0.630	(+/-)	-
			34.SF18-1	-	+	Basic	+	-	1.290	(+/W)	-
			35.SF18-2	-	+	Basic	+	-	0.930	(+/-)	-
			36.SF18-3	-	+	Basic	+	-	1.200	(+/-)	-
11-Nov-97	มะขามเปรี้ยว (Tamarind)/33.5°B	กรุงเทพฯ (สามย่าน)	37.TR19-1	-	+	Basic	+	-	1.182	(+/W)	-
			38.TR19-2	-	+	Basic	+	-	0.588	(+/-)	-
			39.TR20-1	-	+	Basic	+	-	1.176	(+/W)	-
			40.TR20-2	-	+	Basic	+	-	1.104	(+/-)	-
1-Nov-97	ละมุด (Sapodilla)/20.6°B	กรุงเทพฯ (สามย่าน)	41.SL21-1	-	+	Basic	+	-	0.018	(+/-)	-
			42.SL21-2	-	+	Basic	+	-	0.018	(+/-)	-
			43.SL21-3	-	+	Basic	+	-	0.018	(+/-)	-
			44.SL22-1	-	+	Basic	+	-	0.018	(+/-)	-
			45.SL22-2	-	+	Basic	+	-	0.840	(+/-)	-
			46.SL22-3	-	+	Basic	+	-	0.018	(+/-)	-

°B, °Brix ; +, positive ; W, weak positive ; -, negative; NT, not test

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Date	Source/TSS	Place	Strain number	Gram reaction	Catalase test	Oxidation of acetate	Oxidation of lactate	Ketogenesis from glycerol	Acid production in 3 days (%)	Growth at (37/40°C)	Cellulose production in 14 days (mm.)
1-Nov-97	องุ่น (Grape)/19.2°B	กรุงเทพฯ (ราชประสงค์	47.GR23-1	-	+	Basic	+	-	0.018	(+/W)	-
			48.GR23-2	-	+	Basic	+	-	0.018	(+/-)	-
			49.GR23-3	-	+	Basic	+	-	0.468	(+/-)	-
			50.GR24-1	-	+	Basic	+	-	0.570	(+/-)	-
			51.GR24-2	-	+	Basic	+	-	1.248	(+/W)	-
			52.GR24-3	-	+	Basic	+	-	0.900	(+/-)	-
14-Nov-97	ส้มเขียวหวาน (Orange)/ 8°B	กรุงเทพฯ (มหานาค)	53.OR55-1	-	+	Basic	+	-	1.140	(+/W)	-
			54.OR55-2	-	+	Basic	+	-	0.018	(+/W)	-
			55.OR56-1	-	+	Basic	+	-	1.200	(+/+)	-
			56.OR56-2	-	+	Basic	+	-	0.792	(+/-)	-
14-Nov-97	กล้วยไข่ (Banana)/18.6°B	กรุงเทพฯ (มหานาค)	57.BS57-1	-	+	Basic	+	-	0.186	(+/W)	-
			58.BS57-2	-	+	Basic	+	-	1.092	(+/W)	-
			59.BS58-1	-	+	Basic	+	-	0.960	(+/-)	-
			60.BS58-2	-	+	Basic	+	-	1.452	(+/W)	-
14-Nov-97	แอปเปิ้ล (Apple)/11.8°B	กรุงเทพฯ (มหานาค)	61.AP59-1	-	+	Basic	+	-	0.150	(+/W)	-
			62.AP59-2	-	+	Basic	+	-	0.852	(+/-)	-
			63.AP60-1	-	+	Basic	+	-	0.366	(+/-)	-
			64.AP60-2	-	+	Basic	+	-	0.624	(+/-)	-
15-Nov-97	พุทธา (Jujube)/18.2°B	กรุงเทพฯ (มหานาค)	65.JJ63-1	-	+	Basic	+	+	1.116	(+/W)	-
			66.JJ63-2	-	+	Basic	+	+	0.720	(+/-)	-
			67.JJ64-1	-	+	Basic	+	+	0.438	(+/W)	-
			68.JJ64-2	-	+	Basic	+	-	0.012	(+/-)	-
15-Nov-97	มะม่วงแก้วสุก (Mango)/19.4°B	กรุงเทพฯ (มหานาค)	69.MG69-1	-	+	Basic	+	-	0.798	(+/-)	-
			70.MG69-2	-	+	Basic	+	-	1.140	(+/-)	-
			71.MG70-1	-	+	Basic	+	-	0.768	(+/-)	-
			72.MG70-2	-	+	Basic	+	-	0.720	(+/-)	-

°B, °Brix ; +, positive ; W, weak positive ; -, negative; NT, not test

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Date	Source/TSS	Place	Strain number	Gram reaction	Catalase test	Oxidation of acetate	Oxidation of lactate	Ketogenesis from glycerol	Acid production in 3 days (%)	Growth at (37/40°C)	Cellulose production in 14 days (mm.)
16-Nov-97	ฝรั่งเวียดนาม	กรุงเทพฯ	73.GV73-1	-	+	Basic	+	-	0.492	(+/+)	-
	(Guava)/12.1°B	(พรานนก)	74.GV73-2	-	+	Basic	+	-	0.066	(+/-)	-
			75.GV74-1	-	+	Basic	+	-	0.072	(+/-)	-
			76.GV74-2	-	+	Basic	+	-	0.666	(+/-)	-
16-Nov-97	น้อยหน่า	กรุงเทพฯ	77.CA75-1	-	+	Basic	+	-	0.318	(+/+)	-
	(Sugar apple)/17.5°B	(พรานนก)	78.CA75-2	-	+	Basic	+	-	0.270	(+/-)	-
			79.CA76-1	-	+	Basic	+	-	0.270	(+/-)	-
			80.CA76-2	-	+	Basic	+	-	0.330	(+/+)	-
18-Nov-97	สับปะรด	กรุงเทพฯ	81.PA83-1	-	+	Basic	+	-	0.420	(+/-)	-
	(Pineapple)/14.6°B	(พรานนก)	82.PA83-2	-	+	Basic	+	-	0.312	(+/-)	-
			83.PA84-1	-	+	Basic	+	-	0.252	(+/-)	-
			84.PA84-2	-	+	Basic	+	-	0.150	(+/-)	-
18-Nov-97	แตงโม	กรุงเทพฯ	85.WM85-1	-	+	Basic	+	-	0.330	(+/-)	-
	(Watermelon)/9.0°	(พรานนก)	86.WM85-2	-	+	Basic	+	-	0.042	(+/-)	-
			87.WM86-1	-	+	Basic	+	-	0.942	(+/-)	-
			88.WM86-2	-	+	Basic	+	-	0.990	(+/-)	-
19-Nov-97	เงาะ	กรุงเทพฯ	89.RB87-1	-	+	Basic	+	-	0.870	(+/-)	-
	(Rambutan)/14.5°B	(พรานนก)	90.RB87-2	-	+	Basic	+	-	0.903	(+/-)	-
			91.RB88-1	-	+	Basic	+	-	0.906	(+/-)	-
			92.RB88-2	-	+	Basic	+	-	0.972	(+/-)	-
19-Nov-97	กล้วยหอม	กรุงเทพฯ	93.BB90-1	-	+	Basic	+	-	0.918	(+/-)	-
	(Banana)/18.2°B	(พรานนก)	94.BB90-2	-	+	Basic	+	-	0.762	(+/-)	-
			95.BB91-1	-	+	Basic	+	-	0.714	(+/-)	-
			96.BB91-2	-	+	Basic	+	-	0.960	(+/-)	-

°B, °Brix ; +, positive ; W, weak positive ; -, negative; NT, not test

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Date	Source/TSS	Place	Strain number	Gram reaction	Catalase test	Oxidation of acetate	Oxidation of lactate	Ketogenesis from glycerol	Acid production in 3 days (%)	Growth at (37/40°C)	Cellulose production in 14 days (mm.)
19-Nov-97	กล้วยน้ำว้า	กรุงเทพฯ	97.BM92-1	-	+	Basic	+	-	0.126	(+/-)	-
	(Banana)/18.8°B	(พรานนก)	98.BM92-2	-	+	Basic	+	-	0.270	(+/-)	-
			99.BM93.1	-	+	Basic	+	-	0.330	(+/-)	-
			100.BM93-2	-	+	Basic	+	-	0.492	(+/-)	-
20-Nov-97	แอปเปิ้ล	กรุงเทพฯ	101.AP94-1	-	+	Basic	+	-	0.270	(+/-)	-
	(Apple)/11.8°B	(มหานาค)	102.AP94-2	-	+	Basic	+	-	0.780	(+/-)	-
20-Nov-97	ส้มเขียวหวาน	กรุงเทพฯ	103.OR95-1	-	+	Basic	+	+	0.792	(+/W)	-
	(Orange)/8.0°B	(มหานาค)	104.OR95-2	-	+	Basic	+	+	1.146	(+/W)	-
20-Nov-97	องุ่นเขียว	กรุงเทพฯ	105.GG96-1	-	+	Basic	+	+	0.570	(+/W)	-
	(Grape)/19.4°B	(มหานาค)	106.GG96-2	-	+	Basic	+	+	0.552	(+/-)	-
20-Nov-97	ลองกอง	ปทุมธานี	107.LD97-1	-	+	Basic	+	+	0.030	(+/W)	-
	(Long-gong)/13.4°B	(รังสิต)	108.LD97-2	-	+	Basic	+	+	0.450	(+/-)	-
20-Nov-97	มังคุด	ปทุมธานี	109.MT100-1	-	+	Basic	+	+	0.912	(+/W)	-
	(Mangosteen)/18.4°B	(รังสิต)	110.MT100-2	-	+	Basic	+	+	0.678	(+/-)	-
20-Nov-97	ชมพู่	ปทุมธานี	111.RA103-1	-	+	Basic	+	-	0.960	(+/W)	-
	(Rose apple)/6.0°B	(รังสิต)	112.RA103-2	-	+	Basic	+	-	0.978	(+/-)	-
24-Nov-97	สตรอเบอรี่	ปทุมธานี	113.ST106-1	-	+	Basic	+	-	0.966	(+/-)	-
	(Strawberry)/15.1°	(รังสิต)	114.ST106-2	-	+	Basic	+	-	0.900	(+/W)	-
			115.ST107-1	-	+	Basic	+	-	0.918	(+/-)	-
			116.ST107-2	-	+	Basic	+	-	0.702	(+/-)	-
24-Nov-97	ท้อ	ปทุมธานี	117.PH108-1	-	+	Basic	+	-	0.558	(+/-)	-
	(Peach)/12.3°B	(รังสิต)	118.PH108-2	-	+	Basic	+	+	0.072	(+/-)	-
			119.PH109-1	-	+	Basic	+	-	0.756	(+/W)	-
			120.PH109-2	-	+	Basic	+	+	0.126	(+/-)	-
24-Nov-97	มะยม	นนทบุรี	121.SG110-1	-	+	Basic	+	+	0.990	(+/W)	-
	(Star gooseberry)/7.9°B	(ปากเกร็ด)									

°B, °Brix ; +, positive ; W, weak positive ; -, negative; NT, not test

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Date	Source/TSS	Place	Strain number	Gram reaction	Catalase test	Oxidation of acetate	Oxidation of lactate	Ketogenesis from glycerol	Acid production in 3 days (%)	Growth at (37/40°C)	Cellulose production in 14 days (mm.)
28-Nov-97	ขนุน (Jackfruit)/20.5°B	กรุงเทพฯ (พรานนก)	122.JF113-1	-	+	Basic	+	+	0.972	(+/W)	-
28-Nov-97	มะละกอ (Papaya)/12.8°B	กรุงเทพฯ (พรานนก)	123.PY114-1	-	+	Basic	+	-	0.402	(+/W)	-
15-Feb-98	อ้อย (Sugar-cane)/20.2°B	ราชบุรี (ไพธาราม)	124.SC115-1	-	+	Basic	+	+	0.018	(+/-)	-
			125.SC115-2	-	+	Basic	+	+	0.024	(+/-)	-
15-Feb-98	น้ำอ้อย (Sugar-cane juice)/20.2°B	กรุงเทพฯ (พรานนก)	126.SJ116-1	-	+	Basic	+	+	0.552	(+/-)	-
			127.SJ116-2	-	+	Basic	+	+	0.564	(+/-)	-
15-Feb-98	น้ำตาลสด (Palm juice)/21.0°B	กรุงเทพฯ (พรานนก)	128.PJ117-1	-	+	Basic	+	+	0.840	(+/-)	-
			129.PJ117-2	-	+	Basic	+	+	0.888	(+/-)	-
			130.PJ117-3	-	+	Basic	+	+	0.720	(+/-)	-
			131.PJ117-4	-	+	Basic	+	+	0.612	(+/-)	-
15-Feb-98	น้ำหมักขนมจีน (Thai vermicelli) /0°B	เพชรบุรี (บ้านแหลม)	132.TV118-1	-	+	ACID	-	+	0.306	(+/-)	-
			133.TV118-2	-	+	ACID	-	+	0.120	(+/-)	-
			134.TV118-3	-	+	Basic	+	+	0.900	(+/-)	-
			135.TV118-4	-	+	Basic	+	+	0.054	(+/-)	-
15-Feb-98	ข้าวหมาก (Kow-Mak)/25.0°B	ปทุมธานี (รังสิต)	136.KM119-1	-	+	Basic	+	+	0.720	(+/-)	-
			137.KM119-2	-	+	Basic	+	+	0.948	(+/-)	-
			138.KM119-3	-	+	Basic	+	+	0.888	(+/-)	-
			139.KM119-4	-	+	Basic	+	+	0.708	(+/-)	-
15-Feb-98	ลูกแป้งข้าวหมาก (Luuk-Pang)	ปทุมธานี (รังสิต)	140.LP120-1	-	+	Basic	+	+	0.954	(+/-)	-
			141.LP120-2	-	+	Basic	+	+	0.912	(+/-)	-
			142.LP120-3	-	+	Basic	+	+	0.840	(+/-)	-
			143.LP120-4	-	+	Basic	+	+	0.894	(+/-)	-
15-Feb-98	น้ำมะพร้าว (Coconut juice)/14.5°B	กรุงเทพฯ (มหานาค)	144.CJ121-1	-	+	Basic	+	+	0.114	(+/-)	-
			145.CJ121-2	-	+	Basic	+	+	0.120	(+/-)	-

°B, °Brix ; +, positive ; W, weak positive ; -, negative; NT, not test

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Date	Source/TSS	Place	Strain number	Gram reaction	Catalase test	Oxidation of acetate	Oxidation of lactate	Ketogenesis from glycerol	Acid production in 3 days (%)	Growth at (37/40°C)	Cellulose production in 14 days (m
15-Feb-98	ทับทิม	กรุงเทพฯ	146.PG123-1	-	+	ACID	-	+	0.054	(+/-)	-
	(Pomegranate)/10.2°B	(พรานนก)	147.PG123-2	-	+	ACID	-	+	0.084	(+/-)	-
16-Feb-98	เสาวรส	กรุงเทพฯ	148.PF124-1	-	+	Basic	+	+	0.252	(+/W)	-
	(Passion fruit)/12.2°B	(พรานนก)	149.PF124-2	-	+	Basic	+	+	0.228	(+/W)	-
17-Feb-98	มะละกอ	กรุงเทพฯ	150.PY125-1	-	+	ACID	-	+	0.120	(+/-)	-
	(Papaya)/17.3°B	(พรานนก)									
17-Feb-98	มะขามเทศ	กรุงเทพฯ	151.TP126-1	-	+	ACID	-	+	0.072	(+/-)	-
	(Manila tamarind)/4.4°E	(พรานนก)	152.TP126-2	-	+	Basic	+	+	0.414	(+/-)	-
17-Feb-98	น้อยโหน่ง	สระบุรี	153.CA127-1	-	+	Basic	+	+	0.864	(+/-)	-
	(Custard apple)/17.0°B	(หนองแค)	154.CA127-2	-	+	Basic	+	+	0.720	(+/-)	-
18-Feb-98	แคนตาลูป	สระบุรี	155.CT128-1	-	+	Basic	+	+	0.612	(+/-)	-
	(Cantaloup)/11.5°B	(หนองแค)	156.CT128-2	-	+	Basic	+	+	0.570	(+/-)	-
18-Feb-98	แตงไทย	สระบุรี	157.MM129-1	-	+	Basic	+	+	0.552	(+/-)	-
	(Musk-melon)/10.2°B	(หนองแค)	158.MM129-2	-	+	Basic	+	+	0.564	(+/-)	-
28-Feb-98	ดอกเข็มแดง	กรุงเทพฯ	159.F142-1	-	+	ACID	-	+	0.024	(+/-)	-
Ixora lobbii Loud.		(ปทุมวัน)	160.F142-2	-	+	ACID	-	+	0.042	(+/-)	-
28-Feb-98	ดอกพุทธรักษา	กรุงเทพฯ	161.F143-1	-	+	ACID	-	+	0.030	(+/-)	-
Canna indica		(ปทุมวัน)	162.F143-2	-	+	ACID	-	+	0.054	(+/-)	-
28-Feb-98	ดอกจำปี	กรุงเทพฯ	163.F144-1	-	+	ACID	-	+	0.084	(+/-)	-
Michelia longifolia		(ปทุมวัน)	164.F144-2	-	+	ACID	-	+	0.078	(+/-)	-
28-Feb-98	ดอกหางนกยูงไทย	กรุงเทพฯ	165.F145-1	-	+	ACID	-	+	0.102	(+/-)	-
Caesalpinia pulcherrima Sw.		(ปทุมวัน)	166.F145-2	-	+	ACID	-	+	0.120	(+/-)	-
28-Feb-98	ดอกชงโค	กรุงเทพฯ	167.F146-1	-	+	ACID	-	+	0.072	(+/-)	-
Bauhinia purpurea Linn.		(ปทุมวัน)	168.F146-2	-	+	ACID	-	+	0.036	(+/-)	-
28-Feb-98	ดอกลั่นทม	กรุงเทพฯ	169.F147-1	-	+	ACID	-	+	0.060	(+/-)	-
Plumeria rubra		(ปทุมวัน)	170.F147-2	-	+	ACID	-	+	0.048	(+/-)	-
28-Feb-98	ดอกแก้ว	กรุงเทพฯ	171.F148-1	-	+	ACID	-	+	0.042	(+/-)	-
Murraya paniculata Jack		(ปทุมวัน)	172.F148-2	-	+	ACID	-	+	0.030	(+/-)	-

°B, °Brix ; +, positive ; W, weak positive ; -, negative; NT, not test

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Date	Source/TSS	Place	Strain number	Gram reaction	Catalase test	Oxidation of acetate	Oxidation of lactate	Ketogenesis from glycerol	Acid production in 3 days (%)	Growth at (37/40°C)	Cellulose production in 14 days (mm.)
28-Feb-98	ดอกปีบ	กรุงเทพฯ	173.F149-1	-	+	ACID	-	+	0.024	(+/-)	-
Millingtonia hortensis Linn. f.		(ตลิ่งชัน)	174.F149-2	-	+	ACID	-	+	0.054	(+/-)	-
19-Nov-97	กล้วยหอม/18.2°B	กรุงเทพฯ	175.BB150-1	-	+	Basic	+	+	NT	(+/-)	10.51
	(Banana:Big)	(พรานนก)	176.BB150-2	-	+	Basic	+	+	NT	(+/-)	9.42
18-Nov-97	แตงโม	กรุงเทพฯ	177.WM151-1	-	+	Basic	+	+	NT	(+/-)	10.25
	(Watermelon)/9.0°B	(พรานนก)	178.WM151-2	-	+	Basic	+	+	NT	(+/-)	10.10
28-Nov-97	ขนุน	กรุงเทพฯ	179.JF152-1	-	+	Basic	+	+	NT	(+/-)	10.33
	(Jackfruit)/20.5°B	(พรานนก)	180.JF152-2	-	+	Basic	+	+	NT	(+/-)	10.31
20-Nov-97	กล้วยไข่	กรุงเทพฯ	181.BS153-1	-	+	Basic	+	+	NT	(+/-)	10.22
	(Banana)/18.6°B	(พรานนก)	182.BS153-2	-	+	Basic	+	+	NT	(+/-)	9.25
20-Nov-97	แอปเปิ้ล	กรุงเทพฯ	183.AP154-1	-	+	Basic	+	+	NT	(+/-)	9.53
	(Apple)/11.8°B	(มหานาค)	184.AP154-2	-	+	Basic	+	+	NT	(+/-)	8.96
20-Nov-97	ลองกอง	ปทุมธานี	185.LD155-1	-	+	Basic	+	+	NT	(+/-)	9.12
	(Long-gong)/13.4°B	(รังสิต)	186.LD155-2	-	+	Basic	+	+	NT	(+/-)	7.36
1-Aug-98	ลิ้นจี่	กรุงเทพฯ	187.LC155-1	-	+	ACID	-	+	0.024	(+/-)	-
	(Litchi)/16.8°B	(ดอนเมือง)	188.LC155-2	-	+	ACID	-	+	0.024	(+/-)	-
1-Aug-98	ลำไย	กรุงเทพฯ	189.LG156-1	-	+	ACID	-	+	0.030	(+/-)	-
	(Longan fruit)/14.7°B	(ดอนเมือง)	190.LG156-2	-	+	ACID	-	+	0.024	(+/-)	-
1-Aug-98	พุทธา	กรุงเทพฯ	191.JJ157-1	-	+	Basic	+	+	0.852	(+/-)	-
	(Jujube)/18.2°B	(ดอนเมือง)	192.JJ157-2	-	+	ACID	-	+	0.030	(+/-)	-
1-Aug-98	ลองกอง	กรุงเทพฯ	193.LD158-1	-	+	Basic	+	+	0.036	(+/-)	-
	(Long-gong)/13.4°B	(ดอนเมือง)	194.LD158-2	-	+	Basic	+	W	0.900	(+/-)	-
1-Aug-98	ละมุด	กรุงเทพฯ	195.SL159-1	-	+	Basic	+	W	0.726	(+/-)	-
	(Sapodilla)/20.6°B	(ดอนเมือง)	196.SL159-2	-	+	Basic	+	W	0.894	(+/-)	-
1-Aug-98	ระกำ	กรุงเทพฯ	197.ZW160-1	-	+	Basic	+	+	0.030	(+/-)	-
	(Ra-gum)/10.9°B	(ดอนเมือง)	198.ZW160-2	-	+	ACID	-	+	0.042	(+/-)	-

°B, °Brix ; +, positive ; W, weak positive ; -, negative; NT, not test

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Date	Source/TSS	Place	Strain number	Gram reaction	Catalase test	Oxidation of acetate	Oxidation of lactate	Ketogenesis from glycerol	Acid production in 3 days (%)	Growth at (37/40°C)	Cellulose production in 14 days (mm.)
1-Aug-98	มังคุด	กรุงเทพฯ	199.MT161-1	-	+	Basic	+	+	0.714	(+/-)	-
	(Mangosteen)/18.4°B	(ดอนเมือง)	200.MT161-2	-	+	Basic	+	+	0.786	(-/-)	-
1-Aug-98	เงาะ	กรุงเทพฯ	201.RB162-1	-	+	Basic	+	+	0.294	(-/-)	-
	(Rambutan)/14.5°B	(ดอนเมือง)	202.RB162-2	-	+	ACID	-	+	0.054	(+/-)	-
1-Aug-98	น้อยหน่า	กรุงเทพฯ	203.CA163-1	-	+	ACID	-	+	0.534	(+/-)	-
	(Sugar apple)/17.5°B	(ดอนเมือง)	204.CA163-2	-	+	ACID	-	+	0.048	(+/-)	-
1-Aug-98	ฝรั่งเวียดนาม	กรุงเทพฯ	205.GV164-1	-	+	ACID	-	+	0.054	(+/-)	-
	(Guava)/12.1°B	(ดอนเมือง)	206.GV164-2	-	+	ACID	-	+	0.072	(+/-)	-
1-Aug-98	ชมพู่	กรุงเทพฯ	207.RA165-1	-	+	ACID	-	+	0.288	(+/-)	-
	(Rose apple)/6.0°B	(ดอนเมือง)	208.RA165-2	-	+	ACID	-	+	0.012	(+/-)	-
1-Aug-98	กล้วยน้ำว้า	กรุงเทพฯ	209.BM166-1	-	+	ACID	-	+	0.030	(+/-)	-
	(Banana)/18.8°B	(ดอนเมือง)	210.BM166-2	-	+	Basic	+	+	0.048	(-/-)	-
1-Aug-98	ส้มเขียวหวาน	กรุงเทพฯ	211.OR167-1	-	+	Basic	+	+	0.054	(-/-)	-
	(Orange)/8.0°B	(ดอนเมือง)	212.OR167-2	-	+	ACID	-	+	0.732	(+/-)	-
1-Aug-98	แตงโม	กรุงเทพฯ	213.WM168-1	-	+	Basic	+	W	0.780	(+/-)	-
	(Watermelon)/9.0°B	(ดอนเมือง)	214.BM168-2	-	+	Basic	+	W	0.888	(+/-)	-
1-Aug-98	ส้มโอ	กรุงเทพฯ	215.PM169-1	-	+	Basic	+	W	0.852	(+/-)	-
	(Pummelo)/10.2°B	(ดอนเมือง)	216.BM169-2	-	+	Basic	+	W	0.612	(+/-)	-
Acetobacter aceti subsp. *aceti*			TISTR 354	-	+	Basic	+	+	0.588	(+/-)	-
A. aceti subsp. *orleanensis*			TISTR 753	-	+	Basic	+	+	0.174	(W/-)	-
A. pasteurianus			TISTR 1056	-	+	Basic	+	+	0.648	(+/-)	-
Gluconoacetobacter hansenii			TISTR 1054	-	+	Basic	+	+	0.132	(-/-)	-
Ga. liquefaciens			TISTR 1057	-	+	Basic	+	+	0.108	(-/-)	-
Ga. xylinus			TISTR 893	-	+	Basic	+	+	-	(W/-)	10.52
Gluconobacter cerinus			TISTR 756	-	+	ACID	-	+	0.012	(-/-)	-

°B, °Brix ; +, positive ; W, weak positive ; -, negative; NT, not test

4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดอะซิติกหรือเซลลูโลสปริมาณสูง

ได้คัดเลือกเชื้อทุกสายพันธุ์ที่แยกได้มาศึกษาการผลิตกรดหรือเซลลูโลส พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดได้ในช่วง 0.009-1.452 กรัม/มล (ตารางที่ 4.1) และผลการศึกษาการเจริญที่ 37 และ 40 °ซ. พบว่าเชื้อสายพันธุ์ SF 18-1, GR 24-2, OR 56-1, BS 58-2 และ MG 69-2 มีคุณสมบัติเหมาะสมทั้งในด้านการผลิตกรดได้สูง และเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง ดังตารางที่ 4.2 นำเชื้อที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์นี้ไปศึกษาภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการผลิตกรดอะซิติกต่อไป นำเชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้ 12 สายพันธุ์ไปศึกษาการผลิตเซลลูโลสเบื้องต้น ในอาหารเหลวสูตรน้ำมะพร้าวที่เหมาะสม พบว่าเชื้อทั้งหมดสามารถผลิตเซลลูโลสได้หนา 7.36-10.51 มม. ดังตารางที่ 4.1 คัดเลือกเชื้อตัวแทนจากแหล่งผลไม้ชนิดต่างๆ ที่ผลิตเซลลูโลสได้สูง คือ สายพันธุ์ BB 150-1, MM 151-1, JF 152-1, BS 153-1, AP 154-1 และ LD 155-1 (ตารางที่ 4.3) นำเชื้อที่คัดเลือกได้ 6 สายพันธุ์ไปศึกษาการผลิตเซลลูโลสต่อ

ตารางที่ 4.2 เชื้อสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะซิติก

คุณสมบัติ	เชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการผลิตกรด				
	SF 18-1	GR 24-2	OR 56-1	BS 58-2	MG 69-2
เจริญที่อุณหภูมิ					
: 30 ซ.	+	+	+	+	+
: 37 ซ.	+	+	+	+	+
: 40 ซ.	W	W	+	W	-
ปริมาณกรดที่ผลิตได้ (%) ในอาหารที่มีเอธานอล 4%	1.290	1.248	1.200	1.452	1.140

+, positive ; W, weak positive ; -, negative

ตารางที่ 4.3 เชื้อสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส

คุณสมบัติ	เชื้อตัวแทนที่มีคุณสมบัติเหมาะสม					
	BB 150-1	MM 151-1	JF 152-1	BS 153-1	AP 154-1	LD 155-1
เซลลูโลสที่ผลิตได้ (มม.)	10.51	10.25	10.33	10.22	9.53	9.12

4.3 ผลการคัดเลือกเชื้อ *Gluconobacter*

ได้เชื้อที่ไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท 37 สายพันธุ์ ที่แยกได้จาก ลำไย กล้วย พุทรา น้อยหน่า ลิ้นจี่ เงาะ ลางสาด ฝรั่ง ระกำ ทับทิม ส้มเขียวหวาน ชมพู่ มะขามเทศ ขนมจีน ดอกเข็มแดง ดอกพุทธรักษา ดอกจำปี ดอกหางนกยูง ดอกชงโค ดอกลั่นทม ดอกแก้ว และดอกปีบ (ตารางที่ 4.1)

4.4 ผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ (แสดงผลในตารางที่ 4.4)

4.4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ และสรีรวิทยา

- พบว่าเชื้อตัวแทน 142 สายพันธุ์จากเชื้อทั้งหมด 216 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ เซลล์ของเชื้อเหล่านี้มีรูปร่างแท่งสั้น (Short rod) ติดสีแดงของแกรมลบ แฟลกเจลลามีลักษณะเป็นแบบรอบเซลล์ (Peritrichous flagella) 105 สายพันธุ์ และเชื้อ 37 สายพันธุ์เป็นชนิดขั้วเซลล์ (Polar flagella) เชื้อ 87 สายพันธุ์มีโคโลนีกลมขอบเรียบสีครีมเข้ม และเชื้อ 12 สายพันธุ์มีโคโลนีกลมขอบเรียบสีครีมเข้มมีเมือกรอบโคโลนี เชื้อ 19 สายพันธุ์มีโคโลนีกลมขอบเรียบสีน้ำตาล และเชื้อ 24 สายพันธุ์มีโคโลนีกลมขอบเรียบสีครีมเป็นมัน

- พบว่าทุกสายพันธุ์เจริญที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 4.0, 4.5 และ 5.0 แต่บางสายพันธุ์เจริญได้ที่ระดับ 3.0, 3.5, 7.5 และ 8.0 และพบว่าเชื้อเกือบทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่ 37 ^{o}ซ. แต่เชื้อส่วนใหญ่ไม่เจริญที่ 40 ^{o}ซ.

- พบว่าไม่มีเชื้อสายพันธุ์ใดเจริญได้ ที่ระดับความเข้มข้นของกรดอะซิติก 3.0% แต่เชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอธานอลเป็นองค์ประกอบ 8.0% ได้ทั้งที่ 30 และ 37 ^{o}ซ.

4.4.2 ผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมี

- พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์สร้างเอนไซม์คาตาเลส กรดกลูโคนิค และ กรด2-คีโตกลูโคนิค ได้

- พบว่าจากเชื้อทั้งหมด 216 สายพันธุ์ มีเชื้อ 105 สายพันธุ์ สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตทได้ ส่วนเชื้อ 37 สายพันธุ์ให้ผลลบกับการทดสอบ

- พบว่าบางสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีแมนนิทอลเป็นองค์ประกอบ และไม่สามารถสร้างไดไฮดรอกซิอโตนจากกลีเซอรอล กรด 2, 5-ไดคีโตกลูโคนิคและกรด5-คีโตกลูโคนิค

- พบว่าเชื้อ 52 สายพันธุ์ให้ผลบวกกับการทดสอบ VP หรือสามารถสร้างสารไดอะซิติลเมธิลคาร์บินอลได้ ส่วนอีก 90 สายพันธุ์ให้ผลลบ

- พบว่าเชื้อที่คัดเลือกทั้งหมดมีเพียง 19 สายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลได้ รวมทั้งเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *Acetobacter liquefaciens* TISTR 1057^T

-พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญบนอาหารวุ้นที่มีกรดกลูตามิคและอาหารวุ้นโฮเยอร์-เฟรเทอร์ได้ แต่สายพันธุ์มาตรฐาน *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^T สามารถเจริญบนอาหารวุ้นโฮเยอร์-เฟรเทอร์ได้

- พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดได้จาก ดี-กลูโคส และเอธานอล แต่ไม่สามารถใช้แป้ง ดี-เมลิไซโตส แอล-ราฟฟิโนส ซาลิซิน แอล-แรมโนส ดี-ทรีฮาโลส และ เมธานอล

จากผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมีสามารถจัดเชื้อทั้ง 142 สายพันธุ์ได้เป็น 4 กลุ่ม โดยทุกสายพันธุ์มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น สามารถเคลื่อนที่ได้ เป็นแกรมลบ ให้ผลบวกกับการทดสอบแคตาเลส และสามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้

โดยเชื้อกลุ่มที่ 1 มี 52 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 มี 35 สายพันธุ์ ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มมีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบรอบเซลล์ (Peritrichous flagella) และลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ มีลักษณะกลม สีครีมเข้ม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มม. นอกจากนี้ยังสามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท แต่อย่างไรก็ตามสามารถแยกเชื้อกลุ่มที่ 1 ออกจากกลุ่มที่ 2 ได้โดยอาศัยความแตกต่างในการสร้างอะซิติลเมทธิลคาร์บินอล (Acetyl methyl carbinol) หรือการทดสอบ VP รวมทั้งการสร้างกรด 5-ดีโตกลูโคนิค (5-ketogluconic acid) ซึ่งเชื้อกลุ่มที่ 1 สามารถการสร้างสารอะซิติลเมทธิลคาร์บินอล หรือให้ผลการทดสอบ VP เป็นบวก แต่ไม่มีการสร้างกรด 5-ดีโตกลูโคนิค แต่เชื้อในกลุ่มที่ 2 ให้ผลตรงกันข้าม จากลักษณะที่แตกต่างกันดังกล่าวทำให้แยกเชื้อทั้งสองกลุ่มออกจากกันได้

สำหรับการแยกเชื้อกลุ่มที่ 3 ออกจากกลุ่มที่ 5 จะอาศัยลักษณะของแฟลกเจลลา การออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท การผลิตเซลลูโลส การเจริญบนอาหารแมนนิทอล รวมทั้งการผลิตกรดจากซอร์บิทอลและแมนนิทอล ซึ่งเชื้อกลุ่มที่ 3 นั้นมีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบรอบเซลล์ (Peritrichous flagella) สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตทได้ นอกจากนี้ยังผลิตเซลลูโลสได้ แต่ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีแมนนิทอล และไม่สามารถผลิตกรดได้จากซอร์บิทอลและแมนนิทอล แต่สำหรับเชื้อกลุ่มที่ 5 นั้นให้ผลตรงกันข้าม โดยมีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบขั้วเซลล์ (Polar flagella) และจากลักษณะที่แตกต่างกันดังกล่าวทำให้แยกเชื้อกลุ่มที่ 3 ออกจากกลุ่มที่ 5 ออกจากกันได้ ส่วนเชื้อกลุ่มที่ 4 จะอาศัยลักษณะเฉพาะคือ สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลได้ และมีแฟลกเจลลเป็นแบบรอบเซลล์ (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.4 ผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อที่แยกได้

Characteristics / เชื้อ	RB2-1	RB2-2	LG5-2	LG6-1	TM8-2	KL13-2	KL14-1	LS15-3	LS16-1	SF17-1
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (µm)	0.6-0.7x1.8-2.0	0.7-0.8x1.8-2.2	0.6-0.8x1.8-2.4	0.6-0.8x2.0-2.2	0.7-0.8x2.2-2.4	0.6-0.8x2.2-2.4	0.6-0.8x2.4-2.5	0.6-0.8x2.6-2.8	0.6-0.7x2.2-2.4	0.6-0.8x1.8-2.0
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	peri.	NT	peri.	NT	peri.	NT	peri.	peri.	NT	NT
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic
Oxidation of lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ketogenesis from glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ubiquinone type (major part)	Q-9	NT	Q-9	NT	Q-9	NT	Q-9	Q-9	NT	NT
Formation of :										
Acetyl methyl carbinol (VP-test)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Brown pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
2,5-diketogluconic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on :										
ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม
Mannitol agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 40°C	-	W	-	W	-	-	W	W	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

I18744450

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	RB2-1	RB2-2	LG5-2	LG6-1	TM8-2	KL13-2	KL14-1	LS15-3	LS16-1	SF17-1
Acid from carbon sources:										
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
D-fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	+	W	-	-	+	+	+	-
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ribose	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 3% acetic acid :										
30°C, 72 hr	-	NT	-	NT	-	NT	-	-	NT	NT
37°C, 72 hr	-	NT	-	NT	-	NT	-	-	NT	NT
Growth in 8% ethanol :										
30°C, 24 hr	+	NT	+	NT	+	NT	+	+	NT	NT
37°C, 24 hr	+	NT	+	NT	+	NT	+	+	NT	NT

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	SF18-1	TR19-1	TR20-1	TR20-2	SL21-1	GR23-1	GR24-2	OR55-1	OR55-2	OR56-1
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (um)	0.6-0.7x2.0-2.2	0.5-0.8x2.1-2.4	0.5-0.8x2.0-2.2	0.6-0.8x1.8-2.5	0.6-0.8x1.8-2.0	0.6-0.8x1.8-2.2	0.6-0.8x2.0-2.2	0.6-0.8x2.0-2.4	0.6-0.7x1.7-1.9	0.5-0.7x1.8-2.0
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	peri.	peri.	NT	NT	NT	NT	peri.	NT	NT	peri.
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic
Oxidation of lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ketogenesis from glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ubiquinone type (major part)	Q-9	Q-9	NT	NT	NT	NT	Q-9	NT	NT	Q9
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Brown pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5-diketogluconic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม
Mannitol agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
pH 3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 40°C	-	W	W	-	-	W	W	W	W	+

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	SF18-1	TR19-1	TR20-1	TR20-2	SL21-1	GR23-1	GR24-2	OR55-1	OR55-2	OR56-1
Acid from carbon sources:										
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
D-fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-cellobiose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	+	+	W	-	-	-	+
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ribose	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 3% acetic acid :										
30°C, 72 hr	-	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT	-
37°C, 72 hr	-	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	NT	-
Growth in 8% ethanol :										
30°C, 24 hr	+	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	+
37°C, 24 hr	+	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	+

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	BS57-1	BS57-2	BS58-2	AP59-1	JJ63-1	JJ64-1	MG69-2	MG70-2	GV73-1	GV74-2
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (µm)	0.6-0.8x1.8-2.0	0.7-0.9x1.7-2.0	0.6-0.7x1.8-2.0	0.7-0.9x1.6-1.8	0.7-0.9x1.8-2.0	0.6-0.7x1.6-1.8	0.7-0.9x1.5-2.1	0.8-0.9x1.8-2.1	0.5-0.7x1.8-2.0	0.6-0.8x1.5-2.4
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	NT	NT	peri.	peri.	peri.	NT	peri.	NT	peri.	NT
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic
Oxidation of lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ketogenesis from glycerol	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Ubiquinone type (major part)	NT	NT	Q-9	Q-9	Q-9	NT	Q-9	NT	Q-9	NT
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Brown pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5-diketogluconic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม
Mannitol agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
pH 3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 40°C	W	W	W	W	W	W	-	-	+	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	BS57-1	BS57-2	BS58-2	AP59-1	JJ63-1	JJ64-1	MG69-2	MG70-2	GV73-1	GV74-2
Acid from carbon sources:										
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
D-fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-cellobiose	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	+	-	-	-	-	-	W	-	-
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ribose	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 3% acetic acid :										
30°C, 72 hr	NT	NT	-	-	-	NT	-	NT	-	NT
37°C, 72 hr	NT	NT	-	-	-	NT	-	NT	-	NT
Growth in 8% ethanol :										
30°C, 24 hr	NT	NT	+	+	+	NT	+	NT	+	NT
37°C, 24 hr	NT	NT	+	+	+	NT	+	NT	+	NT

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	CA75-1	CA76-2	PA83-1	PA84-1	WM85-2	WM86-1	BB90-1	BM92-1	OR95-1	OR95-2
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (µm)	0.6-0.7x1.6-2.2	0.5-0.7x1.8-2.2	0.6-0.8X1.9-2.2	0.8-0.9x2.2-2.2	0.7-0.9x1.2-1.4	0.7-0.9x1.8-2.0	0.5-0.7x1.5-2.0	0.6-0.7x1.7-1.8	0.6-0.8x1.6-2.1	0.6-0.7x1.6-2.2
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	peri.	NT	peri.	NT	peri.	NT	peri.	peri.	peri.	NT
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic
Oxidation of lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ketogenesis from glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Ubiquinone type (major part)	Q-9	NT	Q-9	NT	Q-9	NT	Q-9	Q-9	Q-9	NT
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Brown pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5-diketogluconic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม
Mannitol agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
pH 3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 40°C	+	+	-	-	-	-	-	-	W	W

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	CA75-1	CA76-2	PA83-1	PA84-1	WM85-2	WM86-1	BB90-1	BM92-1	OR95-1	OR95-2
Acid from carbon sources:										
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-cellobiose	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ribose	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 3% acetic acid :										
30°C, 72 hr	-	NT	-	NT	-	NT	-	-	-	NT
37°C, 72 hr	-	NT	-	NT	-	NT	-	-	-	NT
Growth in 8% ethanol :										
30°C, 24 hr	+	NT	+	NT	+	NT	+	+	+	NT
37°C, 24 hr	+	NT	+	NT	+	NT	+	+	+	NT

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	GG96-1	LD97-1	MT100-1	RA103-1	ST106-2	PH109-1	SG110-1	JF113-1	PY114-1
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (µm)	0.6-0.7x1.7-2.2	0.6-0.8x1.8-2.0	0.6-0.7x1.1-1.8	0.6-0.8x1.2-2.2	0.5-0.7x1.0-1.2	0.5-0.7x1.1-1.3	0.6-0.8x1.2-1.6	0.6-0.8x1.2-1.5	0.6-0.7x1.5-2.2
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	peri.	peri.	peri.	peri.	peri.	peri.	peri.	peri.	peri.
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic
Oxidation of lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ketogenesis from glycerol	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Ubiquinone type (major part)	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Brown pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	+	-	+	-	-	-	-	-	-
2,5-diketogluconic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม
Mannitol agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	-	+	-	+	-	-	-	-	-
pH 3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 40°C	W	W	W	W	W	W	W	W	W

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	GG96-1	LD97-1	MT100-1	RA103-1	ST106-2	PH109-1	SG110-1	JF113-1	PY114-1
Acid from carbon sources:									
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	+	+	-	+	-	-	-	+	+
D-fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannose	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-cellobiose	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	+	-
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ribose	+	+	+	-	-	+	-	-	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 3% acetic acid :									
30°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 8% ethanol :									
30°C, 24 hr	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C, 24 hr	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	SC115-1	SC115-2	SJ116-1	SJ116-2	PJ117-1	PJ117-2	PJ117-3	PJ117-4	TV118-1	TV118-2
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (um)	0.6-0.8x1.2-2.0	0.6-0.8x1.4-2.0	0.6-0.7x1.5-2.2	0.6-0.8x1.5-2.0	0.7-0.8x1.2-2.2	0.6-0.8x1.4-2.0	0.6-0.8x1.8-2.0	0.6-0.8x1.8-2.2	0.5-0.7x1.8-2.6	0.5-0.8x1.8-2.4
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	peri.	NT	peri.	peri.	peri.	peri.	peri.	peri.	Polar	Polar
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Acid	Acid
Oxidation of lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Ketogenesis from glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ubiquinone type (major part)	Q9	NT	Q10	NT	Q9	Q9	NT	NT	Q10	Q10
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Brown pigment	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2,5-diketogluconic acid	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีครีมมัน	สีครีมมัน
Mannitol agar	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
pH 3.5	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 8.0	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	SC115-1	SC115-2	SJ116-1	SJ116-2	PJ117-1	PJ117-2	PJ117-3	PJ117-4	TV118-1	TV118-2
Acid from carbon sources:										
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
D-fructose	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
D-galactose	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
Glycerol	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+	W	W	+	+	+
D-mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	W	W	+	+	-	-	W	W	W	W
D-ribose	W	W	W	W	-	-	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Growth in 3% acetic acid :										
30°C, 72 hr	-	NT	-	-	-	-	-	-	NT	NT
37°C, 72 hr	-	NT	-	-	-	-	-	-	NT	NT
Growth in 8% ethanol :										
30°C, 24 hr	+	NT	-	-	+	+	-	-	NT	NT
37°C, 24 hr	+	NT	-	-	+	+	-	-	NT	NT

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	TV118-3	TV118-4	KM119-1	KM119-2	KM119-3	KM119-4	LP120-1	LP120-2	LP120-3	LP120-4
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (µm)	0.6-0.8x2.1-2.4	0.5-0.7x1.6-1.8	0.6-0.8x1.5-2.0	0.6-0.8x1.6-1.8	0.6-0.8x1.8-2.0	0.6-0.8x2.0-2.2	0.6-0.8x2.2-2.4	0.6-0.8x2.0-2.2	0.6-0.8x2.2-2.4	0.5-0.7x2.0-2.3
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	peri.	Polar	peri.	NT	NT	NT	peri.	NT	NT	NT
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic
Oxidation of lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ketogenesis from glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ubiquinone type (major part)	Q9	Q9	Q9	NT	NT	NT	Q9	NT	NT	NT
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brown pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,5-diketogluconic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม
Mannitol agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	TV118-3	TV118-4	KM119-1	KM119-2	KM119-3	KM119-4	LP120-1	LP120-2	LP120-3	LP120-4
Acid from carbon sources:										
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	W	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	-	+	+	+	-	-	W	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 3% acetic acid :										
30°C, 72 hr	-	-	-	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT
37°C, 72 hr	-	-	-	NT	NT	NT	-	NT	NT	NT
Growth in 8% ethanol :										
30°C, 24 hr	+	+	+	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT
37°C, 24 hr	+	+	+	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	CJ121-1	CJ121-2	PG123-1	PG123-2	PF124-1	PF124-2	PY125-1	TP126-1	TP126-2
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (µm)	0.6-0.8x2.4-2.8	0.5-0.7x2.5-2.8	0.6-0.8x1.5-2.1	0.5-0.8x1.5-2.0	0.5-0.6x1.6-1.8	0.5-0.6x1.8-2.0	0.5-0.7x2.1-2.8	0.6-0.8x2.2-2.6	0.7-0.9x2.7-3.0
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	peri.	peri.	Polar	Polar	peri.	peri.	Polar	Polar	peri.
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Basic	Basic	Acid	Acid	Basic	Basic	Acid	Acid	Basic
Oxidation of lactate	+	+	-	-	+	+	-	-	+
Ketogenesis from glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ubiquinone type (major part)	Q10	NT	Q10	Q10	Q9	Q9	Q10	Q10	Q9
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Brown pigment	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	-	+	+	+
2,5-diketogluconic acid	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีครีมม่วง	สีครีมม่วง	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมม่วง	สีครีมม่วง	สีครีมเข้ม
Mannitol agar	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 3.5	-	-	+	+	-	-	-	+	+
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	-	-	-	-	+	-	-	-	+
pH 8.0	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 40°C	-	-	-	-	W	W	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	CJ121-1	CJ121-2	PG123-1	PG123-2	PF124-1	PF124-2	PY125-1	TP126-1	TP126-2
Acid from carbon sources:									
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	-	-	+	+	+	+	-	-	+
D-fructose	-	-	+	+	-	-	-	-	-
D-galactose	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Glycerol	+	+	+	+	-	-	+	+	-
D-mannose	+	+	+	+	+	W	W	W	+
D-mannitol	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-cellobiose	-	-	W	W	-	-	W	W	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Maltose	-	-	+	+	-	-	-	-	+
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	+	+	-	-	-	-	-
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	W	W	W	W	-	-	W	W	-
D-ribose	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	-	-	+	+	-	-	+	+	-
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Growth in 3% acetic acid :									
30°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 8% ethanol :									
30°C, 24 hr	-	-	+	+	+	+	+	+	+
37°C, 24 hr	-	-	+	+	+	+	+	+	+

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	CA127-1	CA127-2	CT128-1	CT128-2	MM129-1	MM129-2	F142-1	F142-2	F143-1	F143-2
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (µm)	0.8-0.39x2.2-2.4	0.8-0.9x2.0-2.2	0.6-0.8x2.0-2.2	0.7-0.9x2.0-2.4	0.6-0.8x2.2-2.4	0.6-0.8x2.4-2.6	0.6-0.8x1.5-2.2	0.6-0.8x1.5-2.0	0.6-0.8x1.6-1.8	0.6-0.8x1.5-2.0
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	NT	peri.	NT	peri.	NT	peri.	Polar	Polar	Polar	Polar
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Acid	Acid	Acid	Acid
Oxidation of lactate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Ketogenesis from glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ubiquinone type (major part)	NT	Q9	NT	Q9	NT	Q9	Q10	Q10	Q10	Q10
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brown pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,5-diketogluconic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมมัน	สีครีมมัน	สีครีมมัน	สีครีมเข้ม
Mannitol agar	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 3.5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
pH 8.0	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	CA127-1	CA127-2	CT128-1	CT128-2	MM129-1	MM129-2	F142-1	F142-2	F143-1	F143-2
Acid from carbon sources:										
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
D-fructose	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D-galactose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	W
D-mannose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
D-mannitol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-cellobiose	-	W	W	W	+	+	W	W	W	W
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	+	+	+	-	-	W	W	-	W
D-ribose	-	W	W	W	-	-	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Growth in 3% acetic acid :										
30°C, 72 hr	NT	-	NT	-	NT	-	-	-	-	-
37°C, 72 hr	NT	-	NT	-	NT	-	-	-	-	-
Growth in 8% ethanol :										
30°C, 24 hr	NT	+	NT	+	NT	+	+	+	+	+
37°C, 24 hr	NT	+	NT	+	NT	+	+	+	+	+

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	F144-1	F144-2	F145-1	F145-2	F146-1	F146-2	F147-1	F147-2	F148-1	F148-2
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (µm)	0.6-0.8x1.6-1.8	0.6-0.8x1.6-1.8	0.5-0.8x1.8-2.0	0.5-0.8x1.7-1.7	0.6-0.8x1.8-2.0	0.6-0.8x2.0-2.2	0.6-0.8x2.0-2.2	0.5-0.7x1.8-2.0	0.5-0.6x2.0-2.2	0.5-0.7x1.5-2.2
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	Polar	Polar	Polar	Polar	Polar	Polar	Polar	Polar	Polar	Polar
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Acid	Acid	Acid	Acid	Acid	Acid	Acid	Acid	Acid	Acid
Oxidation of lactate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ketogenesis from glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ubiquinone type (major part)	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	NT	NT	NT	NT
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brown pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,5-diketogluconic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมมัน	สีครีมมัน	สีครีมมัน	สีครีมมัน	สีครีมมัน	สีครีมมัน	สีครีมมัน	สีครีมมัน	สีครีมมัน	สีครีมมัน
Mannitol agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 3.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 8.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	F144-1	F144-2	F145-1	F145-2	F146-1	F146-2	F147-1	F147-2	F148-1	F148-2
Acid from carbon sources:										
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-
D-fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannose	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-
D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-cellobiose	W	W	W	W	W	W	-	W	W	W
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	W	W	W	W	-	W	-	W	-	W
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 3% acetic acid :										
30°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 8% ethanol :										
30°C, 24 hr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C, 24 hr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	F149-1	F149-2	BB150-1	BB150-2	WM151-1	WM151-2	JF152-1	JF152-2	BS153-1	BS153-2
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (µm)	0.5-0.8x1.6-2.4	0.6-0.8x2.0-2.2	0.5-0.7x2.0-2.2	0.6-0.8x1.8-2.0	0.5-0.7x1.8-2.2	0.6-0.8x1.8-2.0	0.5-0.7x2.0-2.2	0.5-0.6x1.8-2.0	0.6-0.8x2.0-2.2	0.7-0.9x2.2-2.4
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	Polar	Polar	peri.	NT	peri.	NT	peri.	NT	peri.	NT
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Acid	Acid	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic
Oxidation of lactate	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Ketogenesis from glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ubiquinone type (major part)	NT	NT	Q10	NT	Q10	NT	Q10	NT	Q10	NT
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brown pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,5-diketogluconic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมมัน	สีครีมมัน	สีครีมเข้มมีสีออก	สีครีมเข้มมีสีออก	สีครีมเข้มมีสีออก	สีครีมเข้มมีสีออก	สีครีมเข้มมีสีออก	สีครีมเข้มมีสีออก	สีครีมเข้มมีสีออก	สีครีมเข้มมีสีออก
Mannitol agar	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 3.5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 8.0	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	F149-1	F149-2	BB150-1	BB150-2	WM151-1	WM151-2	JF152-1	JF152-2	BS153-1	BS153-2
Acid from carbon sources:										
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	-	-	W	W	W	W	W	W	W	W
Glycerol	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannitol	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
D-cellobiose	W	W	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	W	W	+	+	W	W	W	+	+
D-ribose	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 3% acetic acid :										
30°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 8% ethanol :										
30°C, 24 hr	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C, 24 hr	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	AP154-1	AP154-2	LD155-1	LD155-2	LC155-1	LC155-2	LG156-1	LG156-2	JJ157-1	JJ157-2
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (µm)	0.7-0.8x2.0-2.5	0.7-0.8x2.0-2.4	0.6-0.8x2.0-2.4	0.5-0.7x1.8-2.2	0.4-0.7x2.1-2.4	0.4-0.6x2.0-2.2	0.5-0.8x2.0-2.4	0.6-0.8x2.0-2.2	0.4-0.6x2.0-2.2	0.6-0.8x2.2-2.4
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	peri.	NT	peri.	NT	Polar	Polar	Polar	Polar	peri.	Polar
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Basic	Basic	Basic	Basic	Acid	Acid	Acid	Acid	Basic	Acid
Oxidation of lactate	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Ketogenesis from glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ubiquinone type (major part)	Q10	NT	Q10	NT	Q10	NT	Q10	NT	Q9	NT
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Brown pigment	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
2,5-diketogluconic acid	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Cellulose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมเข้มมีสีเมือก	สีครีมเข้มมีสีเมือก	สีครีมเข้มมีสีเมือก	สีครีมเข้มมีสีเมือก	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีครีมเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม
Mannitol agar	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
pH 3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	AP154-1	AP154-2	LD155-1	LD155-2	LC155-1	LC155-2	LG156-1	LG156-2	JJ157-1	JJ157-2
Acid from carbon sources:										
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fructose	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
D-mannose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
D-mannitol	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Sucrose	-	-	-	-	W	W	W	W	-	-
D-cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	+	+	W	W	-	-	-	-	-	-
D-ribose	-	-	-	-	+	+	+	+	W	+
Salicin	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	W	W	W	W	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Growth in 3% acetic acid :										
30°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 8% ethanol :										
30°C, 24 hr	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
37°C, 24 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	LD158-1	LD158-2	SL159-1	SL159-2	ZW160-1	ZW160-2	MT161-1	MT161-2	RB162-1	RB162-2
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (µm)	0.6-0.8x2.2-2.4	0.6-0.8x2.0-2.4	0.6-0.8x2.2-2.4	0.8-1.0x2.0-2.2	0.4-0.6x2.2-2.4	0.5-0.6x2.0-2.2	0.4-0.6x2.0-2.2	0.4-0.6x1.8-2.0	0.4-0.6x2.0-2.2	0.6-0.8x2.2-2.4
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	peri.	peri.	peri.	peri.	peri.	Polar	peri.	peri.	peri.	Polar
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Acid	Basic	Basic	Basic	Acid
Oxidation of lactate	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Ketogenesis from glycerol	+	W	W	W	+	+	+	+	+	+
Ubiquinone type (major part)	Q9	NT	Q9	NT	NT	Q10	Q9	NT	NT	Q10
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
Brown pigment	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
2,5-diketogluconic acid	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมมัน	สีน้ำตาลเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมมัน
Mannitol agar	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Temp 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	LD158-1	LD158-2	SL159-1	SL159-2	ZW160-1	ZW160-2	MT161-1	MT161-2	RB162-1	RB162-2
Acid from carbon sources:										
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	+	+	+	W	+	+	+	+	+	W
D-fructose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
D-galactose	W	-	W	-	+	+	+	+	W	+
Glycerol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannitol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Sucrose	-	-	-	-	-	W	-	-	-	+
D-cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ribose	W	-	-	-	+	+	W	W	W	+
Salicin	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	W
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	-	W	-	-	-	W
Sorbitol	-	-	-	-	-	W	-	-	-	+
Growth in 3% acetic acid :										
30°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 8% ethanol :										
30°C, 24 hr	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
37°C, 24 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	CA163-1	CA163-2	GV164-1	GV164-2	RA165-1	RA165-2	BM166-1	BM166-2	OR167-1	OR167-2
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (µm)	0.4-0.6x2.0-2.2	0.6-0.8x2.0-2.4	0.6-0.8x2.0-2.4	0.6-0.8x2.0-2.2	0.4-0.6x2.2-2.4	0.6-0.8x2.0-2.4	0.4-0.6x2.0-2.2	0.6-0.8x2.0-2.2	0.6-0.8x1.8-2.0	0.6-0.8x2.0-2.2
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	Polar	Polar	Polar	Polar	Polar	Polar	Polar	peri.	peri.	Polar
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Acid	Acid	Acid	Acid	Acid	Acid	Acid	Basic	Basic	Acid
Oxidation of lactate	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Ketogenesis from glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ubiquinone type (major part)	Q10	NT	Q10	NT	Q10	NT	Q10	NT	Q9	Q10
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brown pigment	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,5-diketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GBY-agar	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมม่วง
Mannitol agar	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp 37°C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Temp 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	CA163-1	CA163-2	GV164-1	GV164-2	RA165-1	RA165-2	BM166-1	BM166-2	OR167-1	OR167-2
Acid from carbon sources:										
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	W	W	+
D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Sucrose	W	W	W	W	W	W	W	-	-	+
D-cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	W	W	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	+	+	+	+	+	W	+	-	-	W
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	W	W	W	-	-	W	-	-	-	+
Sorbitol	+	+	W	W	W	+	W	-	-	+
Growth in 3% acetic acid :										
30°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 8% ethanol :										
30°C, 24 hr	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
37°C, 24 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	WM168-1	WM168-2	PM169-1	PM169-2	TISTR 354^T	TISTR 753^T	TISTR 1054^T	TISTR1056^T	TISTR 1057^T	TISTR 756^T	TISTR 893
Cell form	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod	sh.rod
Cell size (µm)	0.6-0.8x2.0-2.4	0.5-0.6x2.2-2.4	0.6-0.8x2.0-2.2	0.5-0.8x2.0-2.4	0.6-0.7x1.5-2.0	0.6-0.8x1.2-2.1	0.6-0.7x1.5-3.0	0.6-0.8x1.3-2.2	0.6-0.7x1.5-2.0	0.7-0.8x1.6-2.0	0.5-0.7x1.7-2.0
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagellation	peri.	peri.	peri.	peri.	peri.	peri.	peri.	peri.	peri.	Polar	peri.
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Basic	Acid	Basic
Oxidation of lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Ketogenesis from glycerol	W	W	W	W	+	+	+	+	+	+	+
Ubiquinone type (major part)	Q9	NT	Q9	NT	Q9	Q9	Q10	Q9	Q10	Q10	Q10
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Brown pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Gluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
2,5-diketogluconic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Growth on : ลักษณะโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม	สีครีมเป็นมัน	สีครีมเข้มมีเมือก
Mannitol agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
pH 3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 8.0	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Temp 37°C	+	+	+	+	+	W	-	+	-	-	W
Temp 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; peri., peritrichous ; sh.rod., short rod ; NT, not test

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

Characteristics / เชื้อ	WM168-1	WM168-2	PM169-1	PM169-2	TISTR 354^{T}	TISTR 753^{T}	TISTR 1054^{T}	TISTR1056^{T}	TISTR 1057^{T}	TISTR 756^{T}	TISTR 893
Acid from carbon sources:											
D-glucose (+ve control)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basal medium (-ve control)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabionse	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
D-mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Sucrose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-cellobiose	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
Starch	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-xylose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	W	W	W	-	+	-	-
L-raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-	W	W	-	W	+	W
D-ribose	-	+	W	W	+	+	+	-	+	+	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Growth in 3% acetic acid :											
30°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C, 72 hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 8% ethanol :											
30°C, 24 hr	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
37°C, 24 hr	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative ; NT, not test

ตารางที่ 4.5 ลักษณะของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกที่แยกได้

Characteristics	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V
Number of strains	52	35	12	6	37
Cell form	short rod	short rod	short rod	short rod	short rod
Cell size (µm)	0.4-0.9x1.1-2.8	0.5-0.9x1.1-3.0	0.5-0.9x1.8-2.5	0.5-0.8x1.5-2.8	0.4-0.8x1.5-2.8
Motility	+	+	+	+	+
Flagellation	peritrichous	peritrichous	peritrichous	peritrichous	polar
Gram reaction	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate	Basic	Basic	Basic	Basic	Acid
Oxidation of lactate	+	+	-	+	-
Ketogenesis from glycerol	-37 / +	-3 / W / +25	+	+	+
Ubiquinone type (major part)	Q-9	Q-9	Q-10	Q-10	Q-10
Formation of : Acetyl methyl carbinol (VP-test)	+	-	-	-	-
Brown pigment	-	-	-	+	+ / -24
Gluconic acid	+	+	+	+	+
2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+
5-ketogluconic acid	-	+	+	+	+
2,5-diketogluconic acid	-	-	-	+	+ / -24
Cellulose	-	-	+	-	-
ลักษณะสีโคโลนีบน GEY-agar	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม	สีครีมเข้ม, มีเมือก	สีน้ำตาลเข้ม	สีครีมเป็นมัน / สีน้ำตาลเข้ม
Growth on : Mannitol agar	-	-	-	-	+
Calcium lactate agar	+	+	+	+	+
Glucose-Mannitol-Yeast extract agar	+	+	+	+	+
Glutamate agar	-	-	-	-	-
Hoyer-Frateur medium	-	-	-	-	-
Growth at : pH 3.0	+18 / -	+9 / -	-	-	+17 / -
pH 3.5	+50 / -	+33 / -	+	-	+20 / -
pH 4.0	+	+	+	+	+
pH 4.5	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+
pH 7.5	+50 / -	+	+	-	-
pH 8.0	+50 / -	+33 / -	+	-	-
Temp 37°C	+50 / -	+33 / -	+	+	+
Temp 40°C	+4 / W26 / -22	W3 / -	-	-	-

+, positive ; W, weak positive ; -, negative

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

Characteristics	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V
Number of strains	52	35	12	6	37
D-glucose	+	+	+	+	+
L-arabionse	+38 / -	+33 / W1/ -1	+	-	+18 / W / -17
D-fructose	-	+5 / -	-	-	+19 / -
D-galactose	+26 / W2 / -24	+26 / W / -7	+4 / W	-	+19 / W / -17
Glycerol	-	-	-	+	+36 / W
D-mannose	+50 / W / -1	+32 / W	-	+/W	+19 / W / -15
D-mannitol	-	-	-	-	+
Sucrose	-	+1 / -	+2 / -	-	+2 / W12
D-cellobiose	+16 / -	+5 / W / -27	-	-	W / -17
Starch	-	-	-	-	-
D-xylose	+8 / -	+29 / -	-	+	+19 / -
Maltose	-	+12 / W / -22	-	-	+4 / -
D-melezitose	-	+1 / -	-	-	-
Melibiose	+10 / W3 / -39	+1 / -	-	-	+4 / -
L-raffinose	-	-	-	-	- / +2
Esculin	-	+3 / W / -30	+6 / W6	+ / W4	W / -20
D-ribose	+18 / W / -29	+5 / W / -21	-	+4 / W	+
Salicin	-	-	-	-	- / +14
L-rhamnose	-	-	-	-	-
L-sorbose	+1 / -	+6 / -	-	-	+
D-trehalose	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-	- / W10
Sorbitol	-	-	-	-	+ / W5

+, positive ; W, weak positive ; -, negative

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ผลการศึกษาระบบยูบิควิโนน

พบว่าจากผลระบบยูบิควิโนนสามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 2 กลุ่มคือ เชื้อ 87 สายพันธุ์มียูบิควิโนนชนิด Q-9 และ 55 สายพันธุ์เป็นชนิด Q-10 ดังตารางที่ 4.4

จากผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ และระบบยูบิควิโนนของเชื้อตัวแทนทั้ง 142 สายพันธุ์มาเทียบกับผลของสายพันธุ์มาตรฐาน ทำให้เห็นผลการแบ่งกลุ่มและบ่งบอกลักษณะสายพันธุ์ได้ชัดเจนขึ้น รวมทั้งอาศัยแนวทางการจัดจำแนกของ Holt (1994) ; Yamada และคณะ (1997) และ Stackebrandt (1998)สามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 52 สายพันธุ์ ได้แก่ AP 59-1, BB 90-1, BM 92-1, BS 57-1, BS 57-2, BS 58-2, CA 75-1, CA 76-2, GR 23-1, GR 24-2, GV 73-1, GV 74-2, JF 113-1, JJ 63-1, JJ 64-1, KL 14-1, LD 97-1, LG 5-2, LG 6-1, LS 15-3, LS 16-1, MG 69-2, MG 70-2, OR 55-1, OR 55-2, OR 56-1, OR 95-1, OR 95-2, PA 83-1, PA 84-1, PF 124-2, PH 109-1, PY 114-1, RA 103-1, RB 2-1, RB 2-2, SG 110-1, SL 21-1, ST 106-2, TM 8-2, TR 19-1, TR 20-1, TR 20-2, WM 85-2, WM 86-1, PJ 117-1, JJ 157-1, LD 158-1, ZW 160-1, MT 161-1, MT 161-2 และ RB 162-1 เชื้อกลุ่มนี้มีลักษณะเหมือนกับสายพันธุ์มาตรฐาน *A. pasteurianus* TISTR 1056^{T} และลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อกลุ่มอื่นคือที่สามารถสร้างสารอะซิติลเมทธิลคาร์บินอลได้ หรือให้ผลบวกกับการทดสอบ VP

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 35 สายพันธุ์ ได้แก่ CA 127-1, CA 127-2, CT 128-1, CT 128-2, GG 96-1, KL 13-2, MM 129-1, MM 129-2, MT 100-1, PF 124-1, SF 17-1, SF 18-1, TP 126-2, KM 119-1, KM 119-2, KM 119-3, KM 119-4, LP 120-1, LP 120-2, LP 120-3, LP 120-4, PJ 117-2, SC 115-1, SC 115-2, TV 118-3, TV 118-4, LD 158-2, SL 159-1, SL 159-2, BM 166-2, OR 167-1,WM 168-1, WM 168-2, PM 169-1 และ PM 169-2 เชื้อกลุ่มนี้มีลักษณะเหมือนกับสายพันธุ์มาตรฐาน *A. aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^{T} และ *A. aceti* subsp. *orleanensis* TISTR 753^{T} แต่มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *A. aceti* subsp. *orleanensis* TISTR 753^{T} มากกว่าคือที่สามารถเจริญบนอาหารวุ้น โฮเยอร์-เฟรเทอร์ ได้

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 12 สายพันธุ์ ได้แก่ AP 154-1, AP 154-2, BB 150-1, BB 150-2, BS 153-1, BS 153-2, JF 152-1, JF 152-2, LD 155-1, LD 155-2, WM 151-1 และ WM 151-2 เชื้อกลุ่มนี้มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *Gluconoacetobacter xylinus* TISTR 893 และมีลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อกลุ่มอื่นคือที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้ CJ 121-1, CJ 121-2, PJ 117-3, PJ 117-4, SJ 116-1 และ SJ 116-2 เชื้อกลุ่มนี้มีลักษณะเหมือนกับสายพันธุ์ *Gluconoacetobacter liquefaciens* TISTR 1057^{T} และมีลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อกลุ่มอื่นคือที่มีแฟลกเจลลาเป็นแบบรอบเซลล์สามารถผลิตรงควัตถุสีน้ำตาล และสามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท (ตารางที่ 4.6)

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 37 สายพันธุ์ ได้ PG 123-1, PG 123-2, PY 125-1, TP 126-1, F 142-1, F 142-2, F 143-1, F 143-2, F 144-1, F 144-2, F 145-1, F 145-2, F 146-1, F 146-2, F 147-1, F 147-2, F 148-1, F 148-2, F 149-1, F 149-2, TV 118-1, TV 118-2, LC 155-1, LC 155-2, LG 156-1, LG 156-2, JJ 157-2, ZW 160-2, RB 162-2, CA 163-1, CA 163-2, GV 164-1, GV 164-2, RA 165-1, RA 165-2, BM 166-1 และ OR 167-2 เชื้อกลุ่มนี้มีลักษณะเหมือนกับสายพันธุ์ *Gluconobacter cerinus* TISTR 756^{T} และมีลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อกลุ่มอื่นคือที่ สามารถผลิตกรดจากซอร์บิทอลและแมนนิทอลได้ (ตารางที่ 4.6)

การแสดงการกระจายของเชื้อทั้ง 142 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผลไม้ชนิดต่างๆ 37 ชนิด จากดอกไม้ 8 ชนิด และวัสดุอื่นๆอีก 4 ชนิด เชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 คือ *Acetobacter pasteurianus* ซึ่งพบได้ในผลไม้เกือบทุกชนิดที่ใช้แยกเชื้อ ได้แก่ มะขามเปรี้ยว น้ำตาลสด ละมุด ขนุน มะม่วง องุ่นแดง ลำไย กล้วยหอม กล้วยน้ำว้า กล้วยไข่ มังคุด พุทรา น้อยหน่า สตรอเบอรี่ สับปะรด เงาะ ลองกอง ลางสาด มะละกอ ท้อ แตงโม ฝรั่ง แอปเปิล ระกำ ส้มเขียวหวาน มะยม ชมพู่ มะขามเทศ มะเขือเทศ มะกรูด และ เสาวรส

สำหรับในเชื้อกลุ่มที่ 2 หรือ *A. aceti* พบได้ใน องุ่นเขียว มังคุด น้อยโหน่ง มะเฟือง แคนตาลูป แตงไทย มะขามเทศ มะกรูด และเสาวรส

สำหรับในเชื้อกลุ่มที่ 3 หรือ *Gluconoacetobacter xylinus* พบได้ใน ขนุน กล้วยหอม กล้วยไข่ ลองกอง แอปเปิล และแตงโม

สำหรับในเชื้อกลุ่มที่ 4 หรือ *Ga. liquefaciens* พบได้ใน น้ำตาลสด น้ำอ้อย และน้ำมะพร้าว

สำหรับในเชื้อกลุ่มที่ 5 หรือ *Ga. liquefaciens* พบได้ในลำไย กล้วย พุทรา น้อยหน่า ลิ้นจี่ เงาะ ลางสาด ฝรั่ง ระกำ ทับทิม ส้มเขียวหวาน ชมพู่ มะขามเทศ ขนมจีน ดอกเข็มแดง ดอกพุทธรักษา ดอกจำปี ดอกหางนกยูง ดอกชงโค ดอกลั่นทม ดอกแก้ว และดอกปีบ (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.6 ลักษณะความแตกต่างของเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน

Characteristics / ชื่อและกลุ่มเชื้อ	*Acetobacter pasteurianus* TISTR 1056^T	Group I (52 สายพันธุ์)	*A. aceti subsp. orleanensis* TISTR 753^T	Group II (35 สายพันธุ์)	*A. aceti subsp. aceti* TISTR 354^T	*Gluconoacetobacter xylinus* TISTR 893	Group III (12 สายพันธุ์)	*Gluconoacetobacter liquefaciens* TISTR 1057^T	Group IV (6 สายพันธุ์)	*Gluconobacter cerinus* TISTR 756^T	Group V (37 สายพันธุ์)	*Gluconoacetobacter hansenii* TISTR 1054^T
Flagellation	Peri.	Peri.	Peri.	Peri.	Peri.	Peri.	Peri.	Peri.	Peri.	Polar	Polar	Peri.
Growth on GYPG agar	สีครีมเข้มเป็นมัน	สีครีมเข้มเป็นมัน	สีครีมเข้มเป็นมัน	สีครีมเข้มเป็นมัน	สีครีมเข้มเป็นมัน	สีครีมเข้ม มีเมือก	สีครีมเข้ม มีเมือก	สีน้ำตาล	สีน้ำตาล	สีครีมเป็นมัน	สีครีมเป็นมัน / สีน้ำตาล	สีครีมเข้มเป็นมัน
Acetate & lactate oxidation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Ubiquinone analysis	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10
VP-test	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-ketogluconic formation	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth on Hoyer-Frateur Agar	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose formation	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Acid formation from D-Mannitol and D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Brown pigment formation	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Growth on Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive ; -, negative ; peri., peritrichous

ตารางที่ 4.7 การกระจายของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกในผลไม้ ดอกไม้ และ วัสดุชนิดต่างๆ

Source of samples	Strain no.			Group	Identification in this study
Apple (แอปเปิ้ล)	AP59-1			I	*Acetobacter pasteurianus*
	AP154-1	AP154-2		III	*Gluconoacetobacter xylinus*
Banana (กล้วยหอม)	BB90-1			I	*Acetobacter pasteurianus*
	BB150-1	BB150-2		III	*Gluconoacetobacter xylinus*
Banana (กล้วยน้ำว้า)	BM92-1			I	*Acetobacter pasteurianus*
	BM116-2			II	*Acetobacter aceti*
	BM166-1			V	*Gluconobacter* sp.
Banana (กล้วยไข่)	BS57-1	BS57-2	BS58-2	I	*Acetobacter pasteurianus*
	BS153-1	BS153-2		III	*Gluconoacetobacter xylinus*
Bell apple (เสาวรส)	BA124-2			I	*Acetobacter pasteurianus*
	BA124-1			II	*Acetobacter aceti*
Cantaloup (แคนตาลูป)	CT128-1	CT128-2		II	*Acetobacter aceti*
Sugar apple (น้อยหน่า)	CA75-1	CA76-2		I	*Acetobacter pasteurianus*
	CA163-1	CA163-2		V	*Gluconobacter* sp.
Custard apple (น้อยโหน่ง)	CA127-1	CA127-2		II	*Acetobacter aceti*
Grape (องุ่นแดง)	GR23-1	GR24-2		I	*Acetobacter pasteurianus*
Grape (องุ่นเขียว)	GG96-1			II	*Acetobacter aceti*
Guava (ฝรั่งเวียดนาม)	GV73-1	GV74-2		I	*Acetobacter pasteurianus*
	GV164-1	GV164-2		V	*Gluconobacter* sp.
Jack fruit (ขนุน)	JF113-1			I	*Acetobacter pasteurianus*
	JF152-1	JF152-2		III	*Gluconoacetobacter xylinus*
Jujube (พุทรา)	JJ63-1	JJ64-1	JJ157-1	I	*Acetobacter pasteurianus*
	JJ157-2			V	*Gluconobacter* sp.
Kaffir lime (มะกรูด)	KL14-1			I	*Acetobacter pasteurianus*
	KL13-2			II	*Acetobacter aceti*
Langsat (ลางสาด)	LS15-3	LS16-1		I	*Acetobacter pasteurianus*
Long-gong (ลองกอง)	LD97-1	LD158-1		I	*Acetobacter pasteurianus*
	LD158-2			II	*Acetobacter aceti*
	LD155-1	LD155-2		III	*Gluconoacetobacter xylinus*
Litchi (ลิ้นจี่)	LC155-1	LC155-2		V	*Gluconobacter* sp.

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

Source of samples	Strain no.			Group	Identification in this study
Longan fruit (ลำไย)	LG5-2	LG6-1		I	*Acetobacter pasteurianus*
	LG156-1	LG156-2		V	*Gluconobacter* sp.
Mango (มะม่วง)	MG69-2	MG70-2		I	*Acetobacter pasteurianus*
Mangosteen (มังคุด)	MT100-1			II	*Acetobacter aceti*
	MT161-1	MT161-2		I	*Acetobacter pasteurianus*
Musk melon (แตงไทย)	MM129-1	MM129-2		II	*Acetobacter aceti*
Orange (ส้มเขียวหวาน)	OR55-1	OR55-2	OR56-1	I	*Acetobacter pasteurianus*
	OR95-1	OR95-2		I	*Acetobacter pasteurianus*
	OR167-1			II	*Acetobacter aceti*
	OR167-2			V	*Gluconobacter* sp.
Pineapple (สับปะรด)	PA83-1	PA84-1		I	*Acetobacter pasteurianus*
Peach (พีช)	PH109-1			I	*Acetobacter pasteurianus*
Palm juice (น้ำตาลสด)	PJ117-1			I	*Acetobacter pasteurianus*
	PJ117-2			II	*Acetobacter aceti*
	PJ117-3	PJ117-4		IV	*Gluconoacetobacter liquefaciens*
Papaya (มะละกอ)	PY114-1			I	*Acetobacter pasteurianus*
	PY125-1			V	*Gluconobacter* sp.
Pomelo (ส้มโอ)	PM169-1	169-2		II	*Acetobacter aceti*
Rose apple (ชมพู่)	RA103-1			I	*Acetobacter pasteurianus*
	RA165-1	RA165-2		V	*Gluconobacter* sp.
Rambutan (เงาะ)	RB2-1	RB2-2	RB162-1	I	*Acetobacter pasteurianus*
	RB162-2			V	*Gluconobacter* sp.
Star gooseberry (มะยม)	SG110-1			I	*Acetobacter pasteurianus*
Sapodilla (ละมุด)	SL21-1			I	*Acetobacter pasteurianus*
	SL159-1	SL159-2		II	*Acetobacter aceti*
Strawberry (สตรอเบอรี่)	ST106-2			I	*Acetobacter pasteurianus*
Tomato (มะเขือเทศ)	TM8-2			I	*Acetobacter pasteurianus*
Tamarind (มะขามเปรี้ยว)	TR19-1	TR20-1	TR20-2	I	*Acetobacter pasteurianus*
Water melon (แตงโม)	WM85-2	WM86-1		I	*Acetobacter pasteurianus*
	WM168-1	WM168-2		II	*Acetobacter aceti*
	WM151-1	WM151-2		III	*Gluconoacetobacter xylinus*
Star fruit (มะเฟือง)	SF17-1	SF18-1		II	*Acetobacter aceti*

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

Source of samples	Strain no.			Group	Identification in this study
Manila tamarind (มะขามเทศ)	TP126-2			II	*Acetobacter aceti*
	TP126-1			V	*Gluconobacter* sp.
Khow-Mak (ข้าวหมาก)	KM119-1	KM119-2	KM119-3	II	*Acetobacter aceti*
	KM119-4			II	*Acetobacter aceti*
Lug-Pang (ลูกแป้งข้าวหมาก)	LP120-1	LP120-2	LP120-3	II	*Acetobacter aceti*
	LP120-4			II	*Acetobacter aceti*
Sugar-cane (อ้อย)	SC115-1	SC115-2		II	*Acetobacter aceti*
Thai vermicelli (ขนมจีน)	TV118-3	TV118-4		II	*Acetobacter aceti*
	TV118-1	TV118-2		V	*Gluconobacter* sp.
Coconut juice (น้ำมะพร้าว)	CJ121-1	CJ121-2		IV	*Gluconoacetobacter liquefaciens*
Sugar-cane juice (น้ำอ้อย)	SJ116-1	SJ116-2		IV	*Gluconoacetobacter liquefaciens*
Pome granate (ทับทิม)	PG123-1	PG123-2		V	*Gluconobacter* sp.
Zalacca wallichiana (ระกำ)	ZW160-1			I	*Acetobacter pasteurianus*
	ZW160-2			V	*Gluconobacter* sp.
Ixora lobbii Loud. (ดอกเข็มแดง)	F142-1	F142-2		V	*Gluconobacter* sp.
Canna indica (ดอกพุทธรักษา)	F143-1	F143-2		V	*Gluconobacter* sp.
Michelia longifolia (ดอกจำปี)	F144-1	F144-2		V	*Gluconobacter* sp.
Caesalpinia pulcherrima Sw. (ดอกหางนกยูงไทย)	F145-1	F145-2		V	*Gluconobacter* sp.
Bauhinia purpurea Linn. (ดอกชงโค)	F146-1	F146-2		V	*Gluconobacter* sp.
Plumeria rubra (ดอกลั่นทม)	F147-1	F147-2		V	*Gluconobacter* sp.
Murraya paniculata Jack (ดอกแก้ว)	F148-1	F148-2		V	*Gluconobacter* sp.
Millingtonia hortensis Linn. f. (ดอกปีบ)	F149-1	F149-2		V	*Gluconobacter* sp.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 ผลการศึกษา DNA-DNA hybridization

ผลการศึกษาพบว่าเชื้อกลุ่มที่ 1 จำนวน 31 สายพันธุ์ มีระดับ DNA-DNA homology อยู่ในช่วง 82.7-90.7 % เมื่อเทียบกับ *Acetobacter pasteurianus* TISTR 1056^T จึงจัดเชื้อเหล่านี้เป็น *A. pasteurianus* (ตารางที่ 4.8) เชื้อกลุ่มที่ 2 จำนวน 19 สายพันธุ์มีระดับ DNA-DNA homology อยู่ในช่วง 96.9-103 % เมื่อเทียบกับ *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* TISTR 753^T จึงจัดเชื้อเหล่านี้เป็น *A. aceti* (ตารางที่ 4.9) เชื้อกลุ่มที่ 3 จำนวน 12 สายพันธุ์ ไม่จำเป็นต้องศึกษา DNA-DNA homology เพราะลักษณะทางฟีโนไทป์แตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน เชื้อกลุ่มที่ 4 จำนวน 6 สายพันธุ์ มีระดับ DNA-DNA homology อยู่ในช่วง 90.0-95.7 % เมื่อเทียบกับ *Gluconoacetobacter liquefaciens* TISTR 1057^T จึงจัดเชื้อเหล่านี้เป็น *Gluconoacetobacter liquefaciens* (ตารางที่ 4.10) เชื้อกลุ่มที่ 5 จำนวน 13 สายพันธุ์ มีระดับ DNA-DNA homology อยู่ในช่วง 0.6-43.6 % เมื่อเทียบกับ *Gluconobacter cerinus* TISTR 756^T ซึ่งต่ำกว่า 70 % จึงยังไม่สามารถจัดเชื้อเหล่านี้ไว้ในสปีชีส์ใดได้ (ตารางที่ 4.11)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.8 DNA relatedness ของเชื้อ *A. pasteurianus* (กลุ่มที่ 1)

Strain		% Homology with labeled strains		
		TISTR 753 ^{T}	TISTR 1056 ^{T}	OR 56-1
	GR 24-2	20.7	88.1	100.8
	OR 56-1	20.3	88.7	100.0
	BS 58-2	19.5	87.8	96.7
	PA 83-1	21.2	90.3	99.5
	MG 69-2	21.6	87.2	99.1
	RB 2-1	21.7	86.9	104.8
	LG 5-2	21.3	87.2	101.6
	TM 8-2	20.3	87.3	99.3
	KL 14-1	21.7	88.8	99.3
	LS 15-3	21.1	87.2	97.2
	TR 19-1	20.9	87.3	100.8
	SL 21-1	21.1	89.7	97.2
	BS 57-1	18.7	88.8	104.0
	AP 59-1	9.1	82.3	91.2
	JJ 63-1	13.0	83.0	89.6
	GV 73-1	9.6	83.3	89.9
	CA 75-1	9.1	84.6	90.1
	WM 85-2	8.6	84.0	91.1
	BB 90-1	9.1	84.2	87.9
	BM 92-1	9.1	84.6	90.8
	LD 97-1	6.1	82.8	86.7
	RA 103-1	3.8	82.7	82.7
	ST 106-2	25.4	87.7	97.9
	PM 109-1	28.1	90.7	92.0
	SG 110-1	30.7	90.0	91.9
	JF 113-1	27.2	90.3	91.1
	PY 114-1	25.7	88.7	91.4
	PJ 117-1	23.9	90.7	92.8
	PF 124-2	26.2	90.4	93.5
	ZW 160-1	27.1	90.3	88.9
	MT 161-1	25.7	88.1	92.1
A. aceti subsp. *orleanensis*	TISTR 753 ^{T}	100.0	25.2	26.3
A. pasteurianus	TISTR 1056 ^{T}	17.43	100.00	80.0

ตารางที่ 4.9 DNA relatedness ของเชื้อ *A. aceti* (กลุ่มที่ 2)

Strain		% Homology with labeled strains		
		TISTR 753^T	TISTR 1056^T	SF18-1
	SF18-1	98.6	20.6	100.0
	KL 13-2	99.2	16.9	99.6
	GG 96-1	97.2	16.0	97.0
	MT 100-1	96.9	16.4	95.9
	SC 115-1	97.9	15.6	94.7
	BM 116-2	98.0	15.1	92.9
	PJ 117-2	98.4	18.9	92.6
	TV 118-3	99.1	17.4	96.8
	KM 119-1	98.1	15.9	93.4
	LP 120-1	97.8	17.3	99.7
	TP 126-2	106.1	20.9	90.7
	CA 127-1	100.7	19.6	95.4
	CT 128-2	100.8	20.9	90.6
	MM 129-1	100.5	22.6	90.6
	LD 158-2	101.0	19.2	90.8
	SL 159-1	102.5	19.2	92.2
	OR 167-1	102.3	20.7	95.4
	WM 168-1	102.4	20.0	98.1
	PM 169-1	103.0	19.4	95.2
A. aceti subsp. *orleanensis*	TISTR 753^T	100.0	22.4	92.9
A. pasteurianus	TISTR 1056^T	17.0	100.0	17.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.10 DNA relatedness ของเชื้อ *Gluconoacetobacter liquefaciens* (กลุ่มที่ 4)

Strain		% Homology with labeled strains		
		TISTR 1057^T	TISTR 1054^T	TISTR 1056^T
	SJ 116-1	95.7	9.6	2.3
	SJ 116-2	94.5	10.4	2.5
	PJ 117-3	94.0	11.9	2.7
	PJ 117-4	90.0	17.8	3.9
	CJ 121-1	90.3	11.1	4.5
	CJ 121-2	92.3	10.4	2.7
Gluconoacetobacter liquefaciens	TISTR 1057^T	100.0	15.2	3.0
Gluconoacetobacter hansenii	TISTR 1054^T	21.1	100.0	5.67
Acetobacter pasteurianus	TISTR 1056^T	5.4	3.7	100.0

ตารางที่ 4.11 DNA relatedness ของเชื้อ *Gluconobacter* sp. (กลุ่มที่ 5)

Strain		% Homology with labeled strains		
		TISTR 756^T	TISTR 1057^T	F 142-1
	LC 115-1	2.4	1.4	5.5
	ZW 160-2	1.7	0.8	4.6
	LG 156-2	6.2	4.4	5.1
	JJ 157-2	5.9	5.1	6.4
	TV 118-1	0.6	1.2	5.
	OR 167-2	31.9	9.5	5.7
	PG 123-1	25.0	49.5	3.3
	RB 162-2	3.7	1.2	6.3
	PY 125-1	3.7	1.4	6.4
	F 142-1	36.0	31.2	100.0
	F 145-1	43.6	13.9	102.2
	F 148-1	15.8	6.8	99.3
	F 149-1	17.7	8.1	100.9
Gluconobacter cerinus	TISTR 756^T	100.0	30.7	22.0
Gluconoacetobacter liquefaciens	TISTR 1057^T	27.1	100.0	1.6

4.7 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะซิติก

การทดลองนี้ได้คัดเลือกเชื้อ 5 สายพันธุ์ คือ *Acetobacter pasteurianus* GR 24-2, OR 56-1, BS 58-2 และ MG 69-2 รวมทั้งสายพันธุ์ *A. aceti* SF 18-1 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน *A. aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^{T} เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดอะซิติก ในวันที่ 3 ของการหมัก

4.7.1 ผลการศึกษาปริมาณเอธานอลเริ่มต้นที่เหมาะสม

เมื่อแปรปริมาณเอธานอลเป็น 0, 2.0, 4.0, 6.0 และ 8.0% v/v ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium) ซึ่งประกอบด้วยผงยีสต์สกัด 0.5% ทำการหมักในเครื่องเขย่าแบบหมุนที่อัตรา 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิในการหมักที่ 30 °ซ. พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของเอธานอลที่เติมจะทำให้การผลิตกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมัก ยกเว้นทรีทเมนต์ (Treatment) ที่ไม่ได้ใช้เอธานอล (ตารางที่ 4.12 หรือจากรูปที่ 4.1) พบว่าที่ความเข้มข้นของการเติมเอธานอล 4.0% จะมีการผลิตกรดอะซิติกสูงสุด ดังนี้

สายพันธุ์ SF 18-1 สามารถผลิตกรดได้ 1.448 $\pm$ 0.042%
สายพันธุ์ GR 24-2 สามารถผลิตกรดได้ 1.659 $\pm$ 0.017%
สายพันธุ์ OR 56-1 สามารถผลิตกรดได้ 1.479 $\pm$ 0.052%
สายพันธุ์ BS 58-2 สามารถผลิตกรดได้ 1.376 $\pm$ 0.093%
สายพันธุ์ MG 69-2 สามารถผลิตกรดได้ 1.340 $\pm$ 0.042% และ
สายพันธุ์ *A. aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^{T} สามารถผลิตกรดได้ 1.166 $\pm$ 0.017%

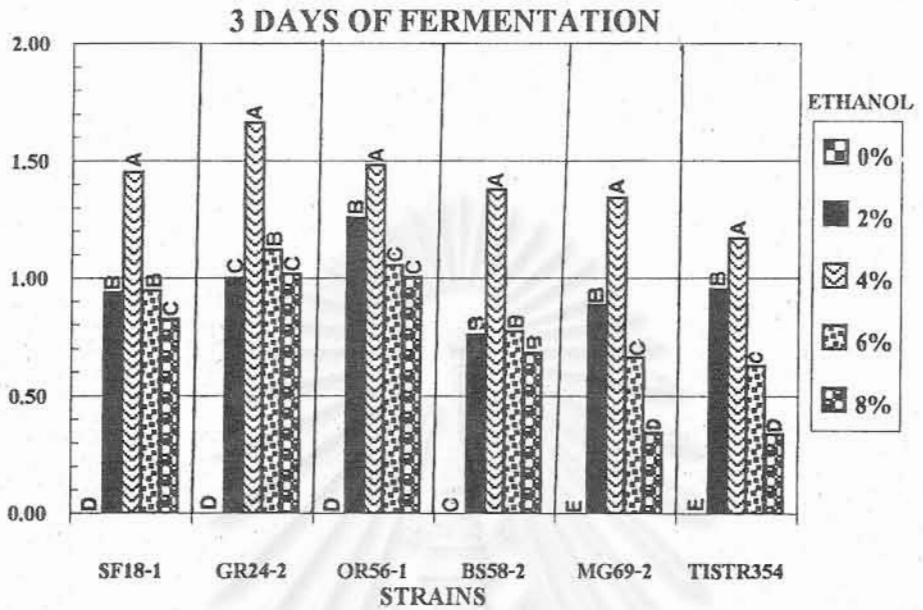
นอกจากนี้ที่ภาวะและเวลาการหมักเดียวกัน เชื้อสายพันธุ์ GR 24-2 สามารถผลิตกรดได้สูงกว่าทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง แต่ก็ไม่ต่างจากสายพันธุ์ OR 56-1 และ SF 18-1 มากนัก ส่วนสายพันธุ์ *A. aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^{T} ผลิตกรดได้ต่ำที่สุด และพบว่าทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดได้สูงสุดเมื่อเติมเอธานอล 4.0% และการเติมเอธานอลที่ 4.0% จะทำให้การผลิตกรดของทุกสายพันธุ์สูงกว่าการเติมเอธานอลที่ระดับความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จึงเลือกการเติมเอธานอลที่ระดับความเข้มข้น 4.0% มาเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และศึกษาการแปรปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นต่อไป

ตารางที่ 4.12 ผลของเอธานอลที่เติมต่อปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตได้ในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ

	เชื้อสายพันธุ์ SF 18-1			เชื้อสายพันธุ์ GR 24-2			เชื้อสายพันธุ์ OR 56-1		
เอธานอลที่เติม (%w/w)	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
0%	0.000± 0.000	0.000± 0.000	**0.000^{d}± 0.000**	0.000± 0.000	0.000± 0.000	**0.000^{d}± 0.000**	0.000± 0.000	0.000± 0.000	**0.000^{d}± 0.000**
2%	0.210± 0.008	0.847± 0.025	**0.938^{b}± 0.017**	0.210± 0.025	0.896± 0.043	**0.998^{c}± 0.051**	0.282± 0.008	1.082± 0.034	**1.256^{b}± 0.042**
4%	0.301± 0.034	1.238± 0.068	**1.448^{a}± 0.042**	0.355± 0.025	1.442± 0.051	**1.659^{a}± 0.017**	0.367± 0.042	1.256± 0.042	**1.479^{a}± 0.052**
6%	0.222± 0.025	0.823± 0.025	**0.944^{b}± 0.008**	0.186± 0.042	1.058± 0.170	**1.118^{b}± 0.017**	0.222± 0.042	0.956± 0.042	**1.052^{c}± 0.026**
8%	0.186± 0.008	0.775± 0.042	**0.823^{c}± 0.025**	0.210± 0.008	0.974± 0.034	**1.016^{c}± 0.042**	0.240± 0.034	0.835± 0.042	**1.004^{c}± 0.009**

	เชื้อสายพันธุ์ BS 58-2			เชื้อสายพันธุ์ MG 69-2			เชื้อสายพันธุ์ TISTR 354^{T}		
เอธานอลที่เติม (%w/w)	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
0%	0.000± 0.000	0.000± 0.000	**0.000^{c}± 0.000**	0.000± 0.000	0.000± 0.000	**0.000^{c}± 0.000**	0.000± 0.000	0.000± 0.000	**0.000^{c}± 0.000**
2%	0.271± 0.043	0.595± 0.042	**0.757^{b}± 0.017**	0.222± 0.026	0.595± 0.042	**0.884^{b}± 0.077**	0.114± 0.009	0.649± 0.034	**0.950^{b}± 0.017**
4%	0.379± 0.009	1.034± 0.017	**1.376^{a}± 0.093**	0.415± 0.042	1.136± 0.042	**1.340^{a}± 0.042**	0.252± 0.017	0.944± 0.026	**1.166^{a}± 0.017**
6%	0.337± 0.017	0.691± 0.026	**0.769^{b}± 0.034**	0.150± 0.009	0.595± 0.009	**0.661^{c}± 0.017**	0.138± 0.026	0.493± 0.017	**0.625^{c}± 0.034**
8%	0.110± 0.032	0.637± 0.017	**0.679^{b}± 0.009**	0.132± 0.034	0.216± 0.017	**0.343^{d}± 0.009**	0.222± 0.009	0.295± 0.026	**0.337^{d}± 0.017**

a, b...ตัวเลขในแถวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกันอย่างน้อยหนึ่งตัวไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



A, B... แผนภูมิแท่งที่มีอักษรกำกับเหมือนกันอย่างน้อยหนึ่งตัวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

รูปที่ 4.1 ผลของปริมาณเอธานอลที่เติมต่อปริมาณกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ในวันที่ 3 ของการหมัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7.2 ผลการศึกษาการใช้ปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่เหมาะสม

เมื่อแปรปริมาณกรดอะซิติกเป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% v/v ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium) ซึ่งประกอบด้วยผงยีสต์สกัด 0.5% เอธานอล 4.0% ทำการหมักในเครื่องเขย่าแบบหมุนที่อัตรา 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิในการหมักที่ 30 °ซ. พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ใช้ คือ ที่ 0.5, 1.0 และ 1.5% จะทำให้การผลิตกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมัก และผลิตกรดสูงกว่าการเติมเอธานอล 4.0% เพียงอย่างเดียว ยกเว้นทรีทเมนต์ที่เติมกรดอะซิติก 2.0% (ตารางที่ 4.13 หรือจากรูปที่ 4.2) ซึ่งทำให้การผลิตกรดลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของกรดเริ่มต้นสูงเกินไปจึงมีผลต่อการเจริญของเชื้อ ทำให้มีการเจริญและผลิตกรดลดลง

พบว่าสายพันธุ์ SF 18-1 และ GR 24-1 สามารถผลิตกรดได้สูงสุดเมื่อเติมกรดอะซิติก 0.5% และการเติมกรดอะซิติก 0.5% นี้จะทำให้การผลิตกรดของทั้ง 2 สายพันธุ์นี้สูงกว่าการเติมกรดอะซิติกที่ระดับความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกการเติมกรดอะซิติกที่ระดับความเข้มข้น 0.5% มาเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับสายพันธุ์ OR 56-1, BS 58-2, MG 69-2 และ *A. aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^{T} สามารถผลิตกรดได้สูงสุดเมื่อเติมกรดอะซิติก 1.0% และการเติมกรดอะซิติก 1.0% นี้จะทำให้การผลิตกรดของทั้ง 4 สายพันธุ์นี้สูงกว่าการเติมกรดอะซิติกที่ระดับความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกการเติมกรดอะซิติกที่ระดับความเข้มข้น 1.0% มาเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และศึกษาการแปรปริมาณกรดคาซามิโนเริ่มต้นต่อไป

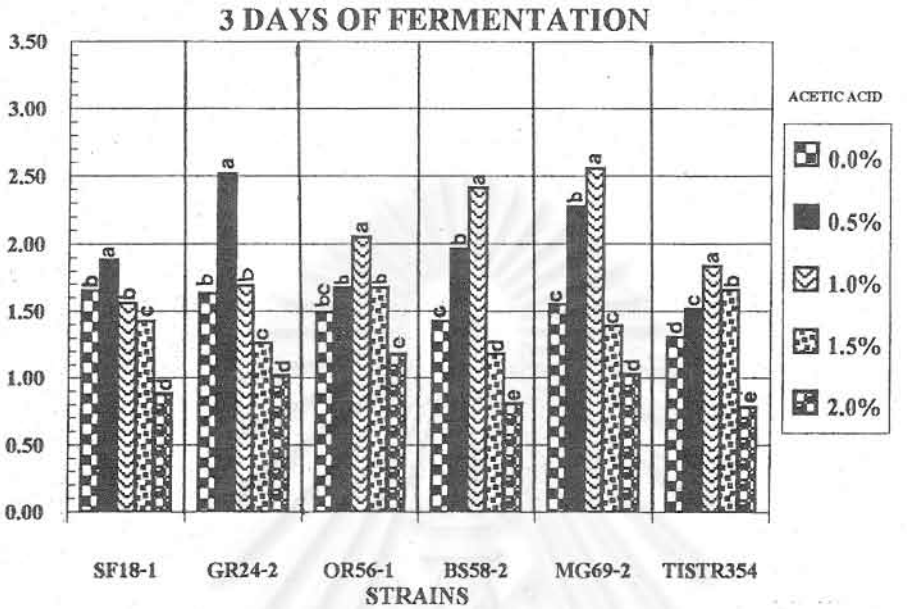
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.13 ผลของกรดอะซิติกที่เติมต่อปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตได้ในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ

	เชื้อสายพันธุ์ SF 18-1			เชื้อสายพันธุ์ GR 24-2			เชื้อสายพันธุ์ OR 56-1		
กรดอะซิติกที่เติม (%w/w)	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
0%	0.944 ± 0.042	1.328 ± 0.076	1.647^{b} ± 0.034	0.703 ± 0.009	1.382 ± 0.051	1.629^{b} ± 0.009	0.884 ± 0.026	1.304 ± 0.059	1.491^{bc} ± 0.137
0.5%	1.058 ± 0.051	1.545 ± 0.111	1.881^{a} ± 0.076	0.896 ± 0.026	1.785 ± 0.059	2.512^{a} ± 0.119	0.890 ± 0.018	1.322 ± 0.017	1.672^{b} ± 0.069
1.0%	0.878 ± 0.035	1.292 ± 0.042	1.557^{b} ± 0.009	0.631 ± 0.009	1.442 ± 0.017	1.689^{b} ± 0.076	0.926 ± 0.034	1.407 ± 0.255	2.047^{a} ± 0.081
1.5%	0.805 ± 0.034	1.166 ± 0.034	1.424^{c} ± 0.042	0.547 ± 0.059	1.082 ± 0.017	1.262^{c} ± 0.051	0.793 ± 0.051	1.202 ± 0.187	1.671^{b} ± 0.221
2.0%	0.613 ± 0.017	0.721 ± 0.017	0.884^{d} ± 0.026	0.529 ± 0.034	0.847 ± 0.026	1.016^{d} ± 0.055	0.673 ± 0.017	1.064 ± 0.059	1.178^{c} ± 0.034

	เชื้อสายพันธุ์ BS 58-2			เชื้อสายพันธุ์ MG 69-2			เชื้อสายพันธุ์ TISTR 354^{T}		
กรดอะซิติกที่เติม (%w/w)	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
0%	0.445 ± 0.017	0.920 ± 0.060	1.424^{c} ± 0.042	0.493 ± 0.017	1.088 ± 0.076	1.551^{c} ± 0.051	0.691 ± 0.009	0.944 ± 0.111	1.304^{d} ± 0.042
0.5%	0.727 ± 0.076	1.376 ± 0.144	1.960^{b} ± 0.153	0.691 ± 0.026	1.563 ± 0.085	2.275^{b} ± 0.035	0.679 ± 0.009	1.040 ± 0.009	1.515^{c} ± 0.052
1.0%	0.920 ± 0.009	1.665 ± 0.076	2.410^{a} ± 0.076	0.944 ± 0.059	1.671 ± 0.068	2.550^{a} ± 0.014	0.914 ± 0.000	1.328 ± 0.026	1.833^{a} ± 0.059
1.5%	0.523 ± 0.042	0.914 ± 0.000	1.178^{d} ± 0.017	0.625 ± 0.017	1.070 ± 0.000	1.389^{c} ± 0.162	0.691 ± 0.026	1.208 ± 0.076	1.653^{b} ± 0.026
2.0%	0.391 ± 0.059	0.649 ± 0.034	0.811^{e} ± 0.026	0.511 ± 0.110	0.902 ± 0.052	1.028^{d} ± 0.009	0.427 ± 0.059	0.691 ± 0.026	0.781^{e} ± 0.034

a, b...ตัวเลขในแถวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกันอย่างน้อยหนึ่งตัวไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



a, b... แผนภูมิแท่งที่มีอักษรกำกับเหมือนกันอย่างน้อยหนึ่งตัวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

รูปที่ 4.2 ผลของปริมาณกรดอะซิติกที่เติมต่อปริมาณกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ในวันที่ 3 ของการหมัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7.3 ผลการศึกษาปริมาณกรดคาซามิโนเริ่มต้นที่เหมาะสม

เมื่อแปรปริมาณกรดคาซามิโนเป็น 0.0%, 0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0% w/v ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium) ซึ่งประกอบด้วยผงยีสต์สกัด 0.5% เอธานอล 4.0% กรดอะซิติกแอซิด 0.5% สำหรับสายพันธุ์ SF 18-1 และ OR 56-1 ส่วนอีก 4 สายพันธุ์ที่เหลือจะเติมกรดอะซิติก 1.0% ทำการหมักในเครื่องเขย่าแบบหมุนที่อัตรา 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิในการหมักที่ 30 °ซ. พบว่าที่ความเข้มข้นของการเติมกรดคาซามิโน 0.5% จะมีการผลิตกรดอะซิติกสูงสุด (ตารางที่ 4.14 หรือจากรูปที่ 4.3) ดังนี้

สายพันธุ์ SF 18-1 สามารถผลิตกรดได้ 2.297 $\pm$ 0.042%
สายพันธุ์ GR 24-2 สามารถผลิตกรดได้ 2.903 $\pm$ 0.068%
สายพันธุ์ OR 56-1 สามารถผลิตกรดได้ 2.512 $\pm$ 0.102%
สายพันธุ์ BS 58-2 สามารถผลิตกรดได้ 2.255 $\pm$ 0.064%
สายพันธุ์ MG 69-2 สามารถผลิตกรดได้ 2.771 $\pm$ 0.093% และ
สายพันธุ์ *A. aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^T สามารถผลิตกรดได้ 2.404 $\pm$ 0.085%

นอกจากนี้ที่ภาวะและเวลาการหมักเดียวกัน เชื้อสายพันธุ์ GR 24-2 สามารถผลิตกรดได้สูงกว่าทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง แต่ก็ไม่ต่างจากสายพันธุ์ MG 69-2 และ OR 56-1 มากนัก ส่วนสายพันธุ์ SF 18-1 ผลิตกรดได้ต่ำที่สุด และพบว่าทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดได้สูงสุดเมื่อเติมกรดคาซามิโน 0.5% การเติมกรดคาซามิโนที่ 0.5% นี้จะทำให้การผลิตกรดของทุกสายพันธุ์สูงกว่าการเติมกรดคาซามิโนที่ระดับความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกการเติมกรดคาซามิโนที่ระดับความเข้มข้น 0.5% มาเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และศึกษาการแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักต่อไป

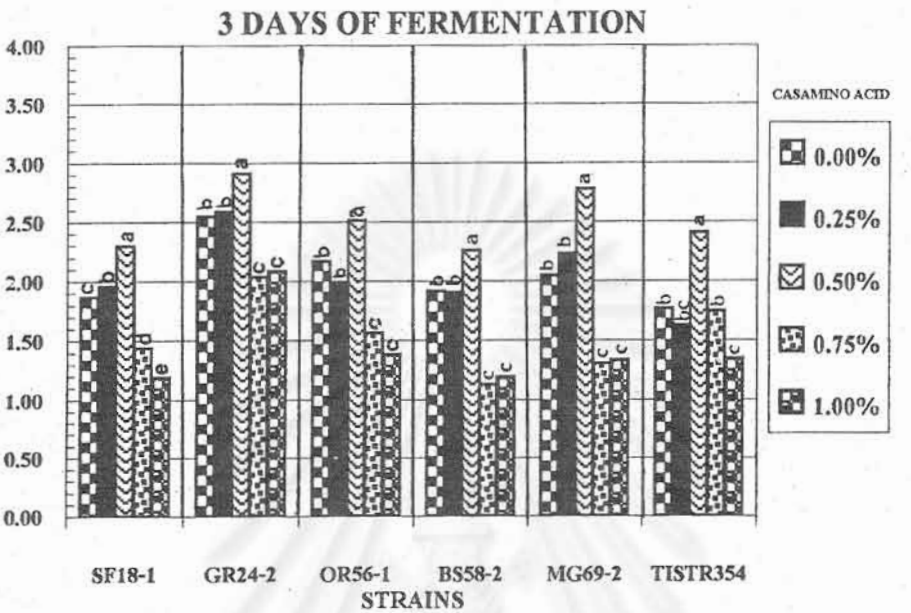
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.14 ผลของกรดคาซามิโนที่เติมต่อปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตได้ในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ

	เชื้อสายพันธุ์ SF 18-1			เชื้อสายพันธุ์ GR 24-2			เชื้อสายพันธุ์ OR 56-1		
กรดคาซามิโนที่เติม (%w/w)	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
0%	1.000± 0.070	1.407± 0.096	4.863^{c}± 0.015	0.897± 0.025	1.820± 0.046	2.540^{b}± 0.027	0.890± 0.018	1.527± 0.255	2.164^{b}± 0.085
0.25%	1.017± 0.061	1.370± 0.053	1.957^{b}± 0.021	1.080± 0.121	1.833± 0.049	2.583^{b}± 0.021	1.010± 0.017	1.863± 0.051	1.991^{b}± 0.028
0.50%	1.217± 0.031	1.640± 0.115	2.297^{a}± 0.042	1.177± 0.049	2.010± 0.030	2.903^{a}± 0.068	1.190± 0.068	1.942± 0.281	2.512^{a}± 0.102
0.75%	0.980± 0.053	1.230± 0.027	1.437^{d}± 0.037	0.817± 0.035	1.223± 0.012	2.033^{c}± 0.025	0.938± 0.051	1.226± 0.119	1.563^{c}± 0.085
1.0%	0.987± 0.006	1.075± 0.045	1.190^{c}± 0.036	0.703± 0.050	1.200± 0.010	2.080^{c}± 0.062	0.769± 0.017	1.340± 0.110	1.382^{c}± 0.085

	เชื้อสายพันธุ์ BS 58-2			เชื้อสายพันธุ์ MG 69-2			เชื้อสายพันธุ์ TISTR 354^{T}		
กรดคาซามิโนที่เติม (%w/w)	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
0%	0.926± 0.017	1.767± 0.085	1.910^{b}± 0.028	0.968± 0.076	1.443± 0.086	2.044^{b}± 0.086	0.890± 0.018	1.250± 0.017	1.767^{b}± 0.017
0.25%	1.015± 0.092	1.815± 0.007	1.901^{b}± 0.070	1.090± 0.014	1.593± 0.059	2.230^{b}± 0.009	0.908± 0.009	1.172± 0.042	1.623^{bc}± 0.000
0.50%	1.056± 0.048	1.913± 0.053	2.255^{a}± 0.064	1.050± 0.057	1.929± 0.076	2.771^{a}± 0.093	1.076± 0.093	1.923± 0.085	2.404^{a}± 0.085
0.75%	0.691± 0.026	0.968± 0.026	1.124^{c}± 0.076	0.974± 0.034	1.028± 0.009	1.304^{c}± 0.110	0.739± 0.059	1.316± 0.110	1.743^{b}± 0.509
1.0%	0.649± 0.153	1.106± 0.102	1.190^{c}± 0.051	1.088± 0.026	1.226± 0.153	1.334^{c}± 0.136	0.721± 0.034	1.124± 0.263	1.341^{c}± 0.230

a, b...ตัวเลขในแถวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกันอย่างน้อยหนึ่งตัวไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



a, b... แผนภูมิแท่งที่มีอักษรกำกับเหมือนกันอย่างน้อยหนึ่งตัวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

รูปที่ 4.3 ผลของปริมาณกรดคาซามิโนที่เติมต่อปริมาณกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆในวันที่ 3 ของการหมัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมัก

จากการใช้เชื้อทั้งหมด 7 สายพันธุ์โดยเพิ่มเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *A. pasteurianus* TISTR 1056^{T} ด้วยและแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักเป็น 30, 37 และ 40 °ซ. ซึ่งอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 5.3 ผลการทดลองพบว่าเชื้อตัวแทนที่คัดเลือกได้คือ SF 18-1, GR 24-1, OR 56-1, BS 58-2 และ MG 69-2 สามารถผลิตกรดได้ใกลเคียงกันทั้งที่ 30 และ 37 °ซ. (ตารางที่ 4.15 หรือรูปที่ 4.4) โดยเฉพาะสายพันธุ์ OR 56-1, BS 58-2 และ MG 69-2 นั้นสามารถผลิตกรดได้สูงทั้งที่ 30°ซ. และ 37°ซ. โดยไม่แตกกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ส่วนเชื้อ *A. aceti* subsp. *aceti* 354^{T} นั้นผลิตกรดที่ 37 °ซ.ได้ต่ำกว่าที่ 30 °ซ. ถึง 0.499% และเชื้อ *A. pasteurianus* TISTR 1056^{T} จะผลิตกรดที่ 37 °ซ.ได้ต่ำกว่าที่ 30 °ซ. ถึง 0.685% และเมื่อพิจารณาการหมักที่ 40 °ซ. พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ผลิตกรดได้ต่ำมาก ยกเว้นสายพันธุ์ OR 56-1 ผลิตกรดได้สูงถึง 1.875 ± 0.051% แต่ต่ำกว่าที่ 37 °ซ. ประมาณ 0.7%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

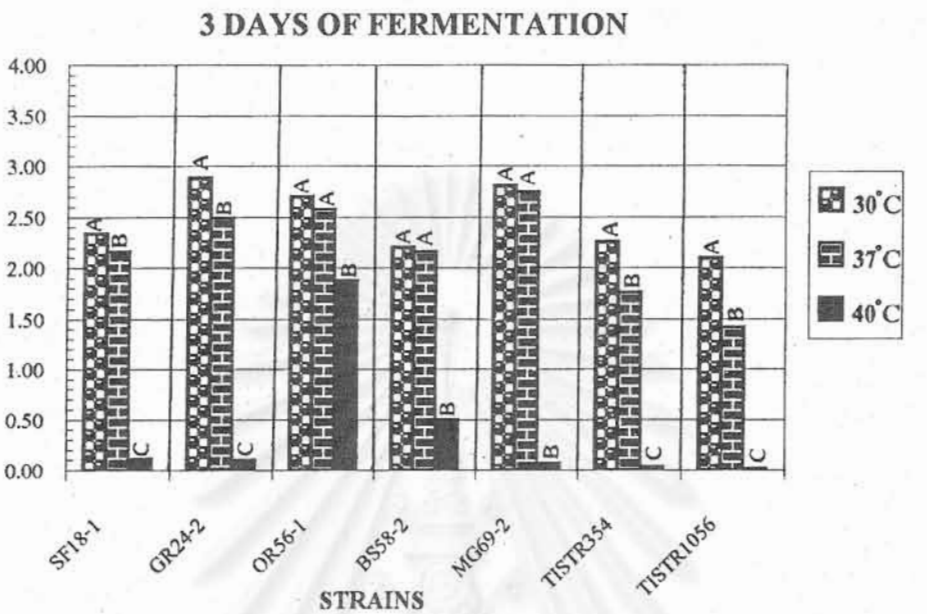
ตารางที่ 4.15 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ต่อปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตได้ในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ

	เชื้อสายพันธุ์ SF 18-1			เชื้อสายพันธุ์ GR 24-2			เชื้อสายพันธุ์ OR 56-1		
อุณหภูมิที่ใช้หมัก (°ซ.)	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
30 °ซ.	1.173 ± 0.021	1.627 ± 0 .078	2.340^{a} ± 0.010	1.163 ± 0.015	1.967 ± 0.015	2.887^{a} ± 0 .025	1.100 ± 0.042	2.044 ± 0.170	2.699^{a} ± 0.077
37 °ซ.	0.870 ± 0.101	1.247 ± 0.016	2.162^{b} ± 0.065	0.950 ± 0.030	1.597 ± 0.015	2.490^{b} ± 0.085	1.010 ± 0.034	1.827 ± 0.068	2.572^{a} ± 0.102
40 °ซ.	0.000 ± 0.000	0.045 ± 0.008	0.108^{c} ± 0.032	0.028 ± 0.003	0.057 ± 0.007	0.093^{c} ± 0.007	0.331 ± 0.008	1.352 ± 0.042	1.875^{b} ± 0.051

	เชื้อสายพันธุ์ BS 58-2			เชื้อสายพันธุ์ MG 69-2			เชื้อสายพันธุ์ TISTR 354^{T}			เชื้อสายพันธุ์ TISTR 1056^{T}		
อุณหภูมิที่ใช้หมัก (°ซ.)	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
30 °ซ.	0.960 ± 0.014	1.803 ± 0.018	2.205^{a} ± 0.007	0.926 ± 0.052	1.917 ± 0.110	2.807^{a} ± 0.230	0.893 ± 0.124	1.677 ± 0.059	2.254^{a} ± 0.195	0.920 ± 0.014	1.431 ± 0.153	2.098^{a} ± 0.094
37 °ซ.	0.661 ± 0.051	1.773 ± 0.076	2.158^{a} ± 0.059	0.836 ± 0.111	1.851 ± 0.034	2.747^{a} ± 0.179	0.493 ± 0.034	1.298 ± 0.034	1.755^{b} ± 0.051	0.283 ± 0.111	1.136 ± 0.025	1.413^{b} ± 0.196
40 °ซ.	0.042 ± 0.008	0.277 ± 0.052	0.499^{b} ± 0.025	0.030 ± 0.008	0.042 ± 0.008	0.066^{b} ± 0.008	0.000 ± 0.000	0.006 ± 0.008	0.030^{c} ± 0.008	0.000 ± 0.000	0.006 ± 0.008	0.012^{c} ± 0.017

a, b...ตัวเลขในแถวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกันอย่างน้อยหนึ่งตัวไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

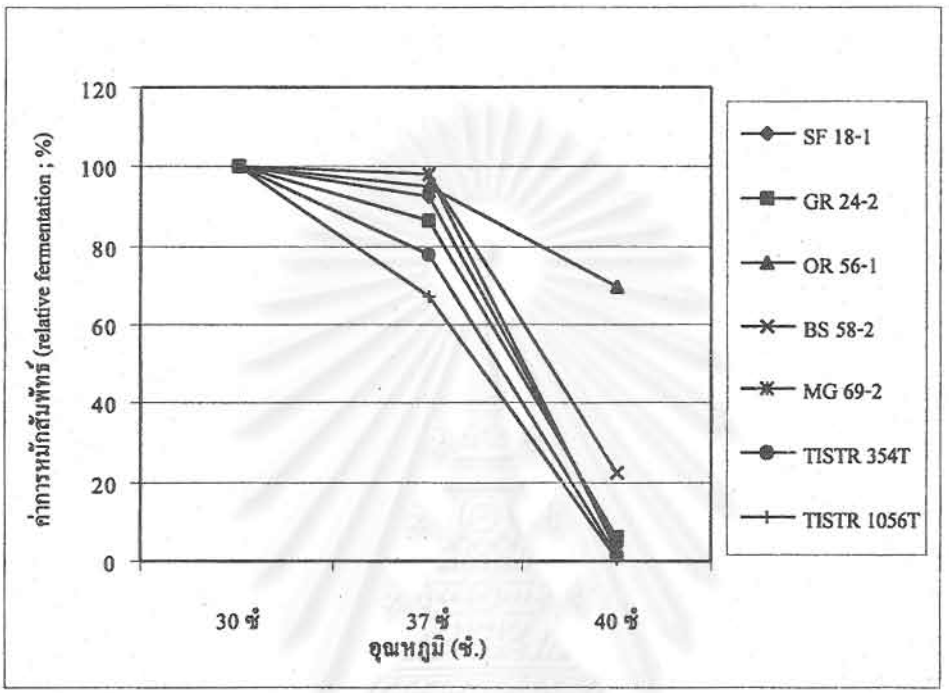


A, B... แผนภูมิแท่งที่มีอักษรกำกับเหมือนกันอย่างน้อยหนึ่งตัวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

<u>รูปที่ 4.4</u> ผลของอุณหภูมิที่ใช้ต่อปริมาณกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นในภาวะเขย่าจากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ในวันที่ 3 ของการหมัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ้านำข้อมูลจากตารางที่ 4.15 มาแสดงเป็นค่าการหมักสัมพัทธ์ในวันที่ 3 ของเชื้อที่ใช้ศึกษาการหมักที่อุณหภูมิ 37°ซ. และ 40°ซ. เปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 °ซ. แสดงดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ค่าการหมักสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 °ซ. ของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเทียบกับการหมักที่ 30 °ซ.

เมื่อพิจารณารูปที่ 4.5 ซึ่งเป็นการแสดงค่าการหมักสัมพัทธ์ (Relative fermentation ; %) ของเชื้อที่ใช้ศึกษาการหมักที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 °ซ. เปรียบเทียบกับการหมักที่ 30 °ซ. โดยค่าเปอร์เซ็นต์ที่ได้นั้นมาจากการคำนวณโดยนำปริมาณกรดที่เชื้อผลิตได้ที่อุณหภูมิการหมัก 30, 37 และ 40 °ซ. ตั้งแล้วหารด้วยปริมาณกรดที่อุณหภูมิการหมักที่ 30 °ซ. แล้วคูณด้วย 100 จะพบว่าเชื้อสายพันธุ์ OR 56-1 มีค่าการหมักสัมพัทธ์สูงมากเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ กล่าวคือสามารถผลิตกรดที่อุณหภูมิ 40 °ซ. ได้เป็น 64.9% เมื่อเทียบกับการหมักที่ 30 °ซ.

4.8 ผลการศึกษาปริมาณการผลิตเซลลูโลส

จากผลการคัดเลือกเชื้อตัวแทนที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูง 6 สายพันธุ์ คือ *Gluconoacetobacter xylinus* BB 150-1,WM 151-1, JF 152-1, BS 153-1, AP 154-2 และ LD 155-1 นำมาศึกษาการผลิตเซลลูโลสเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ *Gluconoacetobacter xylinus* TISTR 893 พบว่าของชั้นของเซลลูโลสมี ความหนาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมักที่ภาวะนิ่ง (Static fermentation) ที่ 30 °ซ. (ตารางที่ 4.16 หรือ รูปที่ 4.6) และความหนาของชั้นเซลลูโลส ในช่วง 9 วันแรกของการหมักจากแต่ละสายพันธุ์นั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่เมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นจนถึงวัน 14 วัน ซึ่งเป็นวันสิ้นสุดการหมักเชื้อสายพันธุ์ WM 151-1, JF 152-1 และ AP 154-1 สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงกว่าสายพันธุ์ *Gluconoacetobacter xylinus* TISTR 893

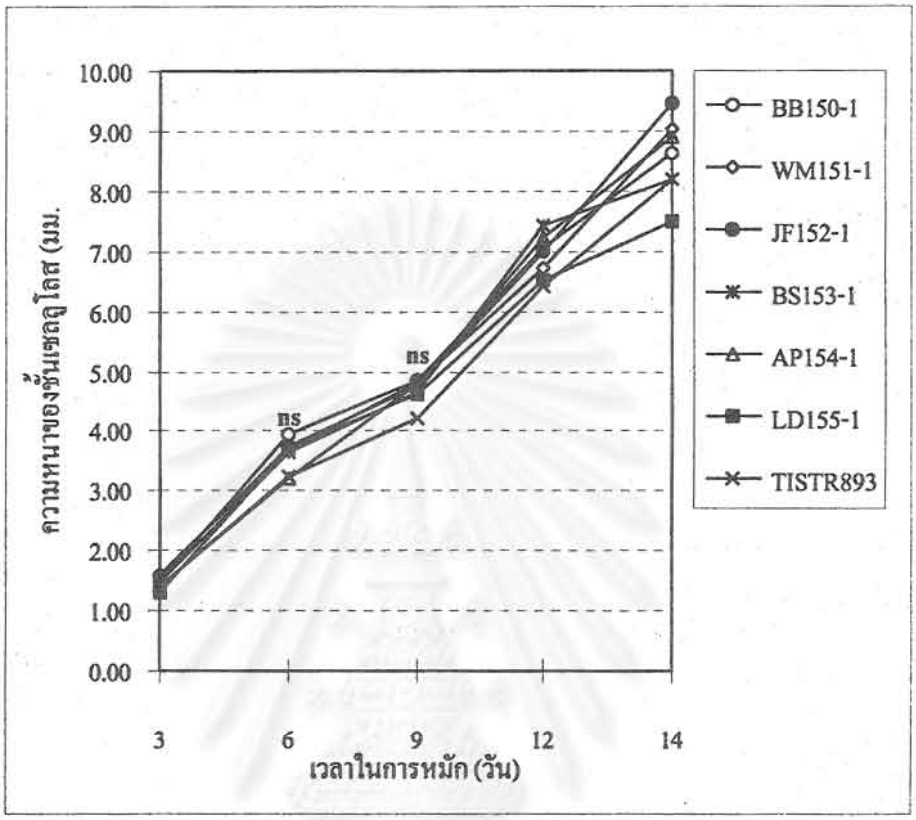
ตารางที่ 4.16 ความหนา (มม.) ของชั้นเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้ในวันที่ 3, 6, 9, 12 และ 14 ของการหมักในอาหารเหลวสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.7) ของเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

	ความหนาของชั้นเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้ (มม.)						
วันที่	BB 150-1	WM 151-1	JF 152-1	BS 153-1	AP 154-1	LD 155-1	TISTR 893
3 $^{(ns)}$	1.47±0.02	1.61±0.26	1.57±0.12	1.46±0.42	1.42 ±0.23	1.32 ±0.17	1.39±0.22
6 $^{(ns)}$	3.94±0.29	3.68±0.08	3.75±0.40	3.66±0.61	3.21±0.02	3.71±0.49	3.25±0.11
9 $^{(ns)}$	4.86±0.32	4.80±0.55	4.76±0.51	4.65±0.62	4.79±0.96	4.60±0.32	4.23±0.10
12	7.06^{ab}±0.19	6.73^{bcd}±0.14	6.99^{abc}±0.23	7.41^{a}±0.21	7.23^{ab}±0.22	6.52^{cd}±0.40	6.46^{d}±0.39
14	8.63^{bc}±0.37	9.03^{ab}±0.48	9.48^{a}±0.36	8.20^{cd}±0.31	8.91^{ab}±0.38	7.48^{d}±0.58	8.18^{cd}±0.35

A, b...ตัวเลขในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกันอย่างน้อยหนึ่งตัวไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

^{ns} = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



NS = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

รูปที่ 4.6 ความหนาของชั้นเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อตัวแทนที่แยกได้ (มม.)

ภายหลังจากการหมักเซลลูโลสของเชื้อที่แยกได้แต่ละสายพันธุ์เสร็จสิ้นแล้ว นำชั้นเซลลูโลสที่ผลิตได้มาวิเคราะห์ น้ำหนักเปียก น้ำหนักแห้ง และแรงสูงสุดที่ใช้เจาะทะลุผ่าน (Penetration force) (ตารางที่ 4.17) พบว่าน้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้ง ให้ผลทางสถิติเป็นไปในทำนองเดียวกันกับข้อมูลด้านความหนาของชั้นเซลลูโลส เมื่อนำชั้นเซลลูโลสที่ผลิตได้มาหาค่าน้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้งพบว่าเชื้อสายพันธุ์ JF 152-1 สามารถผลิตเซลลูโลสมีน้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้งสูงสุดคือ 209.71 ± 8.06 และ 11.53 ± 0.41 กรัม ตามลำดับ และพบว่าค่าแรงสูงสุดเมื่อวัดโดยใช้เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัสชนิดหัวเข็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. ของชั้นเซลลูโลสที่แต่ละเชื้อผลิตขึ้นจะใช้แรงเจาะทะลุผ่าน (Penetration force) อยู่ในช่วง 49.65 ± 5.36 ถึง 56.51 ± 5.48 นิวตัน ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.17 น้ำหนักเปียก น้ำหนักแห้ง (กรัม) และค่าแรงสูงสุดที่เจาะทะลุผ่าน (N.) ภายหลังการหมัก 14 วัน

เชื้อสายพันธุ์ที่ใช้ศึกษา	น้ำหนักเปียก (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	แรงสูงสุดที่เจาะทะลุผ่าน (นิวตัน) $^{(ns)}$
BB 150-1	198.79^{a}±8.04	10.80^{ab}±0.48	52.13±4.53
WM 151-1	200.66^{a}±12.60	10.97^{a}±0.78	56.51±5.48
JF 152-1	209.71^{a}±8.06	11.53^{a}±0.41	54.87±3.89
BS 153-1	182.07^{b}±5.37	9.83^{c}±0.29	54.59±5.78
AP 154-1	197.89^{a}±5.15	10.82^{ab}±0.34	51.58±3.11
LD 155-1	165.41^{c}±9.51	9.10^{c}±0.69	49.65±5.36
TISTR 893	181.55^{b}±4.28	9.98^{bc}±0.06	53.61±3.30

a, b...ตัวเลขในแถวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกันอย่างน้อยหนึ่งตัวไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

^{ns} = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

การอภิปรายผล

5.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกจากแหล่งต่างๆ

จากผลการแยกเชื้อจากผลไม้ 37 ชนิด จากดอกไม้ 8 ชนิด รวมทั้งวัสดุอื่นๆ อีก 4 ชนิด ได้เชื้อ 216 สายพันธุ์ ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียกรดอะซิติกเพราะย้อมติดสีแกรมลบ และสร้างเอนไซม์แคตาเลส จากผลการทดสอบทั้งสองนี้จะช่วยแยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียกรดอะซิติกและแบคทีเรียกรดแลคติกออกจากกันได้ นอกจากนี้แบคทีเรียที่แยกได้ยังสามารถผลิตกรดอะซิติกจากเอธานอลด้วย (Yamada และคณะ, 1997) ผลการทดสอบความสามารถในการออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตทพบว่า 179 สายพันธุ์สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อในสกุล *Acetobacter* ส่วนอีก 37 สายพันธุ์ไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท ซึ่งน่าจะมีความใกล้เคียงกับสกุล *Gluconobacter* (Asai และคณะ, 1964 ; Asai, 1968) และผลการทดสอบนี้ทำให้ทราบเบื้องต้นว่าเชื้อที่แยกได้นั้นมีลักษณะที่แตกต่างกันและเป็นข้อมูลในการเลือกเชื้อตัวแทนไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ส่วนการวัดค่า TSS จากผลไม้ทั้งหมด 37 ชนิด และวัสดุที่ใช้ในการแยกเชื้อนั้น มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4.1-33.5 °B. นั่นก็คือไม่ว่าผลไม้จะมีค่า TSS สูงหรือต่ำก็สามารถพบแบคทีเรียกรดอะซิติกได้ (ตารางที่ 4.1)

5.2 การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดอะซิติกหรือเซลลูโลสปริมาณสูง

5.2.1 การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดอะซิติกได้ปริมาณสูง

สำหรับสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดอะซิติกปริมาณสูงนั้นได้คัดเลือกไว้ 5 สายพันธุ์ คือ GR 24-2, OR 56-1, BS 58-2 และ MG 69-2 รวมทั้ง *A. aceti* SF 18-1 (ตารางที่ 4.6) ซึ่งสามารถผลิตกรดได้สูงสุด 5 อันดับแรก ในช่วง 1.140-1.452 กรัม/100มล. (ตารางที่ 4.2) และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิถึง 37 °ซ. โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ OR 56-1 สามารถเจริญได้ที่ 40 °ซ. ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีความน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาปัจจัยเบื้องต้นที่มีผลต่อการผลิตกรดอะซิติก เพราะเชื้อที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูในปัจจุบันเหมาะสมกับการหมักที่ 30 °ซ. เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น 1-2 °ซ. จะทำให้การหมักช้าลงหรือหยุดชะงัก เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้เป็น Mesophile ดังนั้นในโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชูหรือกรดอะซิติกจึงต้องมีระบบหล่อเย็น (Cooling system) เพื่อลดอุณหภูมิลงให้เหมะกับเชื้อซึ่งทำให้เสียค่าใช้จ่ายในระบบนี้สูง (นภา โล่ห์ทอง, 2520 ; Theeragool และคณะ, 1997)

5.2.2 การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูง

เชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูง 6 สายพันธุ์ได้แก่ BB 150-1, WM 151-1, JF 152-1, BS 153-1, AP 154-2 และ LD 155-1 (ตารางที่ 4.7) ซึ่งเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์นี้สามารถผลิตเซลลูโลสได้หนาในช่วง 9.12-10.51 มม. ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.7) ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 30 มล. ใช้เวลาในการหมัก 7 วัน เซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้นอกจากเพื่อการบริโภคแล้ว ยังสามารถใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมการผลิตเซลลูโลส โดยเฉพาะอย่างยิ่งในต่างประเทศ เช่นประเทศญี่ปุ่นได้หันมาให้ความสนใจเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อกลุ่มนี้มากขึ้นเนื่องจากมีความบริสุทธิ์สูงและมีคุณภาพดี (Toyosaki และคณะ, 1995)

5.3 การคัดเลือกเชื้อ *Gluconobacter*

สามารถแยกเชื้อที่ไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท 37 สายพันธุ์ ซึ่งคาดว่าจะเป็น *Gluconobacter* (Asai และคณะ, 1964 ; Asai, 1968)

5.4 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ

ภายหลังจากการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและทางชีวเคมีของเชื้อแล้วทำให้สามารถจัดกลุ่มเชื้อทั้งหมด 142 สายพันธุ์ มีลักษณะรูปร่างเซลล์เป็นท่อนสั้น (Short rod) ย้อมติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา สร้างกรดอะซิติกจาก เอธานอล สร้างเอนไซม์แคตาเลส รวมทั้งยังสามารถผลิตกรดกลูโคนิคและกรด 2-คีโตกลูโคนิค และจากลักษณะอื่นๆที่แตกต่างกันหลายประการทำให้สามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 5 กลุ่มดังนี้ (ตารางที่ 4.5-4.6)

เชื้อกลุ่มที่ 1 มี 52 สายพันธุ์มีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบรอบเซลล์ (Peritrichous flagella) และมีลักษณะโคโลนีกลมสครีมเข้มบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท เชื้อกลุ่มนี้เมื่อเลี้ยงไม่สร้างเมือกหรือเซลลูโลสขณะเจริญ แต่เชื้อกลุ่มนี้ให้ผลบวกกับการทดสอบ VP หรือสามารถสร้างอะซิติลเมทธิลคาร์บินอลได้ แต่ไม่สามารถผลิตกรด 5-คีโตกลูโคนิค เชื้อนี้มีลักษณะเฉพาะเหมือนกับสายพันธุ์มาตรฐาน *Acetobacter pasteurianus* TISTR 1056^T (ตารางที่ 4.5-4.6)

เชื้อกลุ่มที่ 2 มี 35 สายพันธุ์ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อกลุ่มที่ 1 คือเชื้อกลุ่มนี้ให้ผลลบกับการทดสอบ VP หรือไม่สามารถสร้างอะซิติลเมทธิลคาร์บินอล แต่สามารถผลิตกรด 5-คีโตกลูโคนิคได้ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะเหมือนกับสายพันธุ์มาตรฐาน *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^T และ *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* TISTR 753^T (ตารางที่ 4.5-4.6) แต่เชื้อกลุ่มที่ 2 นี้ไม่สามารถเจริญ

บนอาหารวุ้นโฮเยอร์- เฟรเทอร์ (Hoyer-Frateur agar) ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับเชื้อมาตรฐาน *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* TISTR 753^T

เชื้อกลุ่มที่ 3 มี 12 สายพันธุ์ โดยเชื้อกลุ่มนี้จะมีลักษณะแตกต่างจากเชื้อกลุ่มที่ 1 และ 2 อย่างชัดเจนก็ คือมีลักษณะโคโลนีกลมสีครีมและมีเมือกของเซลลูโลสเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ ส่วนการเจริญในอาหารเหลวนั้นจะมีการสร้างชั้นเซลลูโลสอยู่บนผิวหน้าของอาหาร (Colvin และคณะ, 1977 ; Toyosaki และคณะ, 1995) ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่เหมือนกับ *Ga. xylinus* TISTR 893 - (ตารางที่ 4.5-4.6)

เชื้อกลุ่มที่ 4 มี 6 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบรอบเซลล์เหมือนเชื้อกลุ่มที่ 1-3 แต่สามารถผลิตรงควัตถุสีน้ำตาลบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ และสามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตทซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Ga. liquefaciens* (Holt, 1994 ; Yamada และคณะ, 1997) เชื้อกลุ่มนี้มีลักษณะที่สำคัญเหมือนกับเชื้อมาตรฐาน *Ga. liquefaciens* TISTR 1057^T (ตารางที่ 4.5-4.6)

เชื้อกลุ่มที่ 5 มี 37 สายพันธุ์ เชื้อกลุ่มนี้มีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบขั้วเซลล์ (Polar flagella) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Gluconobacter* (Holt, 1994 ; Yamada และคณะ, 1997) ส่วนลักษณะโคโลนีมีสีครีมเป็นมันเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ มีสีครีมเป็นมัน เชื้อกลุ่มนี้ไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท แต่สามารถผลิตกรดจากซอร์บิทอลและแมนนิทอล (Yamada และคณะ, 1997) เชื้อกลุ่มนี้มีลักษณะที่สำคัญเหมือนกับเชื้อมาตรฐาน *Gluconobacter cerinus* TISTR 756^T (ตารางที่ 4.5-4.6)

5.5 <u>การศึกษาระบบยูบิควิโนน</u>

จากผลการศึกษาระบบยูบิควิโนนทำให้ช่วยยืนยันการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่มชัดเจนยิ่งขึ้น คือ

เชื้อกลุ่มที่ 1 มีจำนวน 52 สายพันธุ์ (หน้า 67) เชื้อตัวแทนของกลุ่มนี้มียูบิควิโนนชนิด Q-9 และให้ผลบวกกับการทดสอบ VP จึงจัดเป็น *A. pasteurianus* (Asai และคณะ, 1964 ; De Ley และ Fratuer, 1974 ; De Ley และคณะ, 1984 ; Urakami และคณะ, 1989 ; Holt, 1994 Yamada และคณะ, 1997) สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปใน มะขามเปรี้ยว น้ำตาลสด ละมุด ขนุน มะม่วง องุ่นแดง ลำไย กล้วยหอม กล้วยน้ำว้า กล้วยไข่ มังคุด พุทรา น้อยหน่า สตรอเบอรี่ สับปะรด เงาะ ลองกอง ลางสาด มะละกอ ท้อ แตงโม ฝรั่ง แอปเปิล ระกำ ส้มเขียวหวาน มะยม ชมพู่ มะขามเทศ มะเขือเทศ มะกรูด และเสาวรส (ตารางที่ 4.7)

เชื้อกลุ่มที่ 2 จำนวน 35 สายพันธุ์ (หน้า 67) เชื้อตัวแทนกลุ่มนี้มียูบิควิโนนชนิด Q-9 ให้ผลลบกับการทดสอบ VP แต่สามารถผลิตกรด 5-คีโตกลูโคนิคได้ จึงจัดเป็น *A. aceti* (Asai และคณะ, 1964 ; De Ley และ Fratuer, 1974 ; Urakami และคณะ, 1989 ; Holt, 1994 ; Yamada และคณะ, 1997) สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปในองุ่นเขียว มังคุด น้อยโหน่ง มะเฟือง แคนตาลูป แตงไทย มะขามเทศ มะกรูด และเสาวรส (ตารางที่ 4.7)

เชื้อกลุ่มที่ 3 จำนวน 12 สายพันธุ์ (หน้า 67) เชื้อตัวแทนกลุ่มนี้มียูบิควิโนนชนิด Q-10 และสามารถผลิตเซลลูโลสได้จึงจัดเป็น *Ga. xylinus* (De Ley และ Fratuer, 1974 ; Yamada, 1983 ; Holt, 1994 ; Urakami และคณะ, 1989 ; Yamada และคณะ, 1997) สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปในขนุน กล้วยหอม กล้วยไข่ ลองกอง แอปเปิล และแตงโม (ตารางที่ 4.7)

เชื้อกลุ่มที่ 4 จำนวน 6 สายพันธุ์ (หน้า 68) เชื้อตัวแทนกลุ่มนี้มียูบิควิโนนชนิด Q-10 มีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบรอบเซลล์สามารถผลิตรงควัตถุสีน้ำตาลและสามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตทจึงจัดเป็น *Ga. liquefaciens* (Asai และคณะ, 1964 ; Asai, 1968 ; De Ley และ Fratuer, 1974 ; De Ley และคณะ, 1984 ; Holt, 1994 ; Yamada และคณะ, 1997) สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปใน น้ำตาลสด น้ำอ้อย และน้ำมะพร้าว (ตารางที่ 4.7)

เชื้อกลุ่มที่ 5 มี 37 สายพันธุ์ (หน้า 68) เชื้อตัวแทนกลุ่มนี้มียูบิควิโนนชนิด Q-10 มีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบ ขั้วเซลล์ ส่วนลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ มีสีครีมเป็นมัน เชื้อกลุ่มนี้ไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท แต่สามารถผลิตกรดได้จากซอร์บิทอลและแมนนิทอลจึงจัดเป็น *Gluconobacter* species (Asai และคณะ, 1964 ; De Ley และ Fratuer, 1974 ; De Ley และคณะ, 1984 ; Holt, 1994 ; Yamada และคณะ, 1997) สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปใน ลำไย กล้วย พุทรา น้อยหน่า ลิ้นจี่ เงาะ ลางสาด ฝรั่ง ระกำ ทับทิม ส้มเขียวหวาน ชมพู่ มะขามเทศ ขนมจีน ดอกเข็มแดง ดอก-พุทธรักษา ดอกจำปี ดอกหาง- นกยูง ดอกชงโค ดอกลั่นทม ดอกแก้ว และ ดอกปีบ (ตารางที่ 4.7)

5.6 <u>การศึกษา DNA-DNA hybridazation</u>

จากการศึกษา DNA relatedness ของเชื้อทำให้ช่วยยืนยันความถูกต้องของการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อได้ โดยพบว่าเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 1 จำนวน 31 สายพันธุ์ มีระดับ DNA-DNA homology อยู่ในช่วง 82.7-90.7 % เมื่อเทียบกับ *Acetobacter pasteurianus* TISTR 1056^T จึงจัดเชื้อเหล่านี้เป็น *A. pasteurianus* (ตารางที่ 4.8) เชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2 จำนวน 19 สายพันธุ์มีระดับ DNA-DNA homology อยู่ในช่วง 96.9-103 % เมื่อเทียบกับ *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* TISTR 753^T จึงจัดเชื้อเหล่านี้เป็น *A. aceti* (ตารางที่ 4.9) เชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3 จำนวน 12 สายพันธุ์ ไม่จำเป็นต้องศึกษา DNA-DNA homology เพราะลักษณะทางฟีโนไทป์แตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน เชื้อตัวแทนกลุ่มที่ 4 จำนวน 6 สายพันธุ์มีระดับ DNA-DNA homology อยู่ในช่วง 90.0-95.7% เมื่อเทียบกับ *Ga. liquefaciens* TISTR 1057^T จึงจัดเชื้อเหล่านี้เป็น *Ga. liquefaciens* (ตารางที่ 4.10) เชื้อตัวแทนใน กลุ่มที่ 5 จำนวน 13 สายพันธุ์ มีระดับ DNA-DNA homology อยู่ในช่วง 0.6-43.6 % เมื่อเทียบกับ *Gluconobacter cerinus* TISTR 756^T ซึ่งต่ำกว่า 70 % จึงไม่สามารถจัดเชื้อเหล่านี้ไว้ในสปีชีส์นี้ (ตารางที่ 4.11) (Wayne และคณะ, 1987 ; Ezaki และคณะ, 1989 ; Tanasupawat และคณะ, 1992)

5.7 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะซิติก

ได้นำเชื้อสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดได้ปริมาณสูงที่ได้คัดเลือกไว้ คือ *Acetobacter pasteurianus* GR 24-2, OR 56-1, BS 58-2 และ MG 69-2 และ *A. aceti* SF 18-1 โดยเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดในวันที่ 3 ของการหมัก กับเชื้อมาตรฐาน *A. aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^{T}

5.7.1 ศึกษาปริมาณเอธานอลเริ่มต้นที่เหมาะสม

ในการผลิตกรดอะซิติกนั้น เอธานอลเป็นซับสเตรทที่สำคัญที่สุดจึงได้เลือกศึกษาเป็นปัจจัยแรก โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น (Basal medium) ประกอบด้วย ผงยีสต์สกัด 0.5% w/v และน้ำกรอง 100 มล. และแปรปริมาณเอธานอลเป็น 0, 2, 4, 6 และ 8% v/v จากผลการวิจัยนี้พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของเอธานอล 4.0% ทำให้เชื้อทุกสายพันธุ์ผลิตกรดได้สูงสุด เนื่องจากเอธานอลเป็นซับสเตรทที่จะเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกโดยอาศัยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสและอะเซตัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนสจากเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก (Allgeier และ Hildebrandt, 1960) และพบว่าเชื้อตัวแทนทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันในช่วง 1.479-1.659 กรัม/100 มล. แต่เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *A. aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^{T} ผลิตกรดได้ต่ำที่สุด คือ 1.166 กรัม/100 มล. (ตารางที่ 4.12) ได้มีงานวิจัยการผลิตกรดของ Ohmori และคณะ (1980) ซึ่งใช้เชื้อสายพันธุ์ *A. aceti* subsp. *aceti* S-13 ที่แยกได้จากผลไม้ในประเทศญี่ปุ่น โดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย ผงยีสต์สกัด 0.5% โพลีเปปโตน (Polypeptone) 0.2% กลูโคส 3.0% กรดอะซิติก 1.0% และเอธานอล 4.0% ในภาวะเขย่าแบบไปกลับ (Reciprocating shake) ที่อัตรา 120 รอบต่อนาที พบว่าที่เวลาการหมัก 3 วัน เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตกรดได้ถึง 4.0กรัม/100 มล. การที่เชื้อของ Ohmori และคณะ (1980) สามารถผลิตกรดได้สูงกว่างานวิจัยในขั้นตอนนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยผงยีสต์สกัด เอธานอล ซึ่งเหมือนกับสูตรอาหารเริ่มต้นในขั้นตอนของงานวิจัยนี้ได้ใช้ แต่เขาได้เติมโพลีเปปโตน 0.2% กลูโคส 3.0% และกรดอะซิติก 1.0% ด้วย นอกจากนี้เขายังได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 6.25% v/v ในขณะที่งานวิจัยนี้ใช้เชื้อเริ่มต้นเพียง 1.0% v/v

5.7.2 ศึกษาปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่เหมาะสม

ในขั้นตอนนี้อาหารเลี้ยงเชื้อจึงประกอบด้วย ผงยีสต์สกัด 0.5% เอธานอล 4.0% และน้ำ 100 มล. เมื่อแปรปริมาณกรดอะซิติกเป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% v/v พบว่ามีการผลิตกรดสูงขึ้นกว่าการเติมเอธานอลอย่างเดียว เชื้อเกือบทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดได้สูงที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่เติม 1.0% ยกเว้นสายพันธุ์ SF 18-1 และ GR 24-2 สามารถผลิตกรดได้สูงเมื่อเติมกรดอะซิติก 0.5% การที่เติมกรดอะซิติกลงไปทำให้การผลิตกรดสูงขึ้นนี้สามารถอธิบายได้ว่า ทั้งเอธานอลและกรดอะซิติกที่เติมในปริมาณที่เหมาะสมนี้จะเป็นปัจจัยเสริมกันทำให้เชื้อเจริญและผลิตกรดได้เร็วขึ้น โดยไปช่วยลด

ระยะ Lag phase ของเชื้อ (Nanba และคณะ, 1984) จากขั้นตอนของงานวิจัยนี้ ปริมาณเอธานอลที่ 4.0% และกรดอะซิติกที่ 0.5-1.0% จะเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะซิติก นอกจากนี้ Adam (1985) ยังได้เสนอว่าในการผลิตน้ำส้มสายชูทั่วๆไปนั้นไม่สามารถทำให้เกิดภาวะปลอดเชื้อได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องเติมกรดอะซิติกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเบื้องต้นเพื่อยับยั้งการปนเปื อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามการเติมกรดอะซิติกลงไปก็มีข้อจำกัด เนื่องจากอะซิติกแบคทีเรียโดยทั่วไปจะเจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดเป็นด่างในช่วง 5.4-6.3 ซึ่งถ้าเติมกรดอะซิติกเริ่มต้นมากเกินไปก็จะไปมีผลต่อการเจริญและการผลิตของเชื้อ (De Ley และคณะ, 1984) และจากการวิจัยยังพบว่าเชื้อที่แยกได้ทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน โดยสายพันธุ์ OR 56-1, BS 58-2 และ MG 69-2 สามารถผลิตกรดได้ในวันที่ 3 ของการหมักในช่วง 2.047-2.550 กรัม/100 มล. ที่ระดับการเติมกรดอะซิติก 1.0% ส่วนสายพันธุ์ SF 18-1 และ GR 24-2 สามารถผลิตกรดได้ 1.881-2.512 กรัม/100 มล. ที่ระดับการเติมกรดอะซิติก 0.5% แต่เชื้อ *A. aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^{T} สามารถผลิตกรดได้ 2.428 กรัม/100มล. ที่ระดับการเติมกรดอะซิติก 1.0% (ตารางที่ 4.13) ซึ่งจะพบว่าผลิตกรดได้ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับทุกสายพันธุ์

5.7.3 ศึกษาปริมาณกรดคาซามิโนเริ่มต้นที่เหมาะสม

การวิจัยขั้นนี้อาหารประกอบด้วยผงยีสต์สกัด 0.5% เอธานอล4.0% กรดอะซิติก 0.5% สำหรับสายพันธุ์ SF 18-1 และ GR 24-2 และที่ระดับ 1.0% สำหรับสายพันธุ์ OR 56-1, BS 58-2, MG 69-2 และสายพันธุ์มาตรฐาน *A. aceti* TISTR 354^{T} เมื่อแปรปริมาณกรดคาซามิโนเป็น 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.0% w/v พบว่าการผลิตกรดอะซิติกของทุกสายพันธุ์สูงขึ้นกว่าการเติมเอธานอลและกรดอะซิติกร่วมกันเท่านั้น โดยมีเปอร์เซ็นต์กรดที่ผลิตได้ในวันที่ 3 ของการหมักอยู่ในช่วง 2.255-2.903 กรัม/100 มล. (ตารางที่ 4.14) ซึ่งเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดได้สูงเมื่อเติมกรดคาซามิโน 0.5% การที่เชื้อสามารถผลิตกรดอะซิติกสูงมากขึ้นนั้นอธิบายได้ว่า กรดคาซามิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้เร็วยิ่งขึ้นและส่งผลให้มีกิจกรรมในเซลล์รวมทั้งความสามารถในการผลิตกรดเป็นไปได้มากและรวดเร็วขึ้นนั่นเองซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mori และ Harada (1973)

5.7.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมัก

ภายหลังการศึกษาเบื้องต้นถึงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของแต่ละสายพันธุ์แล้ว จึงได้นำเชื้อทุกสายพันธุ์ไปศึกษาแปรอุณหภูมิในการหมักที่ 30, 37 และ 40 °ซ. ซึ่งในขั้นตอนนี้ได้มีการเพิ่มเชื้อ *A. pasteurianus* TISTR 1056^{T} ในการหมักเปรียบเทียบด้วย เนื่องจากสายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดได้ที่อุณหภูมิสูง (เผด็จ วัชรโกมลพันธ์, 2540) จากผลการวิจัยในวันที่ 3 ของการหมักพบว่า การหมักที่ 37 °ซ. เชื้อสายพันธุ์ที่ คัดเลือกได้ทุกสายพันธุ์ ได้แก่ SF 18-1, GR 24-2, OR 56-1, BS 58-2 และ MG 69-2 สามารผลิตได้สูงถึง 86.2-97.9% เมื่อเทียบกับการหมักที่ 30 °ซ. แต่

สำหรับสายพันธุ์มาตรฐาน *A. aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^{T} และ *A. pasteurianus* TISTR 1056^{T} สามารผลิตได้เพียง 77.9 และ 67.3% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการหมักที่ 30 °ซ. และเมื่อพิจารณาการหมักที่ 40 °ซ. พบว่าเชื้อเกือบทุกสายพันธุ์ผลิตกรดได้ต่ำมากหรือแทบไม่ผลิตเลย คือมีค่าการหมักสัมพัทธ์ต่ำกว่า 10% เมื่อเทียบกับการหมักที่ 30 °ซ. แต่สายพันธุ์ OR 56-1 สามารถผลิตกรดได้ที่ 40 °ซ. ได้สูงถึง 69.5% เมื่อเทียบกับการหมักที่ 30 °ซ. ดังนั้นจึงเป็นเชื้อที่น่าสนใจ เพราะสามารถผลิตกรดและทนอุณหภูมิได้สูง ซึ่งทำให้การหมักดำเนินต่อไปได้แม้อุณหภูมิจะสูงขึ้นบ้างซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในส่วนระบบหล่อเย็นลงได้ (นภา โล่ห์ทอง, 2520)

นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *A. pasteurianus* GR 24-2, OR 56-1, BS 58-2 และ MG 69-2 รวมทั้งสายพันธุ์ *A. aceti* SF 18-1 สามารถผลิตกรดได้สูงสุดเมื่อเติมเอธานอล 4.0% กรดอะซิติก 0.5 หรือ 1.0% กรดคาซามิโน 0.5% ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีผงยีสต์สกัดเริ่มต้น 0.5% ที่อุณหภูมิการหมัก 30-37 °ซ. แต่ *A. pasteurianus* OR 56-1 สามารถผลิตกรดที่อุณหภูมิ 40 °ซ. ได้ถึง 1.875 กรัม/100 มล. (ตารางที่ 4.15) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Saeki และคณะ (1997) ที่ได้ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดของเชื้อ "*Acetobacter lovaniensis*" SKU 1108 และ SKU 1104 ซึ่งแยกได้จากผลไม้ทำการหมักในถังหมัก (Jar fermentor) ในอาหารที่แหล่งคาร์บอนเริ่มต้นได้แก่ เอธานอล 4.0% และกรดอะซิติก 1.0% ที่อุณหภูมิ 40°ซ. พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดได้ 2.2-2.4 กรัม/100 มล. ในวันที่ 3 ของการหมักตามลำดับ ซึ่งการที่เชื้อ SKU 1108 และ SKU 1104 สามารถผลิตกรดได้สูงกว่าเชื้อ OR 56-1 นั้นอาจเป็นเพราะ Saeki และคณะ (1997) ได้ใช้ถังหมักที่สามารถควบคุมภาวะต่างๆได้ จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอะซิติก (นภา โล่ห์ทอง, 2520)

5.8 <u>การศึกษาปริมาณการผลิตเซลลูโลส</u>

การผลิตเซลลูโลสจากสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ได้แก่ *Ga. xylinus* BB 150-1, WM 151-1, JF 152-1, BS 153-1, AP 154-1 และ LD 155-1 เปรียบเทียบกับการผลิตเซลลูโลสกับสายพันธุ์ *Ga. xylinus* TISTR 893 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.7) พบว่าในช่วง 9 วันแรกของการหมักนั้น ความหนาของชั้นเซลลูโลสที่ผลิตได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (รูปที่ 4.6) เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 14 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เกือบทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงกว่าสายพันธุ์ *Ga. xylinus* TISTR 893 สำหรับค่าแรงเจาะทะลุผ่านโดยใช้เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของเซลลูโลสที่ผลิตได้จากแต่ละสายพันธุ์นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเซลลูโลส น้ำหนักเปียกในช่วง 165.41-209.71 กรัม และน้ำหนักแห้ง 9.10-11.53 กรัม ในวันที่ 14 ของการหมัก (ตารางที่ 4.17)

เชื้อที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการผลิตเซลลูโลสเพื่อการบริโภค (Nata De Coco) และอุตสาหกรรมการผลิตเซลลูโลสเช่นเดียวกับในต่างประเทศ (Toyosaki และคณะ, 1995) ดังนั้นจึงต้องการเชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงและรวดเร็ว ซึ่งเซลลูโลสที่ได้จากแหล่งนี้มีความบริสุทธิ์สูงและจะช่วยลดมลพิษในขั้นตอนการผลิตเส้นใยเซลลูโลสจากไม้ได้ (Cannon และ Anderson, 1991)

เพราะสามารถผลิตกรดและทนอุณหภูมิได้สูง ซึ่งทำให้การหมักดำเนินต่อไปได้แม้อุณหภูมิจะสูงขึ้นบ้าง ซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในส่วนระบบหล่อเย็นลงได้ (นภา โล่ห์ทอง, 2520)

นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *Acetobacter pasteurianus* GR 24-2, OR 56-1, BS 58-2 และ MG 69-2 รวมทั้งสายพันธุ์ *A. aceti* SF 18-1 สามารถผลิตกรดได้สูงสุดเมื่อเติมเอธานอล 4.0% กรดอะซิติก 0.5 หรือ 1.0% กรดคาซามิโน 0.5% ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีผงยีสต์สกัดเริ่มต้น 0.5% ที่อุณหภูมิการหมัก 30-37 °ซ. แต่ *A. pasteurianus* OR 56-1 สามารถผลิตกรดที่อุณหภูมิ 40 °ซ. ได้ถึง 1.875 กรัม/100 มล. (ตารางที่ 4.15) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Saeki และคณะ (1997) ที่ได้ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดของเชื้อ "*Acetobacter lovaniensis*" SKU 1108 และ SKU 1104 ซึ่งแยกได้จากผลไม้ทำการหมักในถังหมัก (Jar fermentor) ในอาหารที่แหล่งคาร์บอนเริ่มต้นได้แก่ เอธานอล 4.0% และกรดอะซิติก 1.0% ที่อุณหภูมิ 40 °ซ. พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดได้ 2.2-2.4 กรัม/100 มล. ในวันที่ 3 ของการหมักตามลำดับ ซึ่งการที่เชื้อ SKU 1108 และ SKU 1104 สามารถผลิตกรดได้สูงกว่าเชื้อ OR 56-1 นั้นอาจเป็นเพราะ Saeki และคณะ (1997) ได้ใช้ถังหมักที่สามารถควบคุมภาวะต่างๆได้ จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอะซิติก (นภา โล่ห์ทอง, 2520)

5.8 <u>การศึกษาปริมาณการผลิตเซลลูโลส</u>

การผลิตเซลลูโลสจากสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ได้แก่ *Gluconoacetobacter xylinus* BB 150-1, WM 151-1, JF 152-1, BS 153-1, AP 154-1 และ LD 155-1 เปรียบเทียบกับการผลิตเซลลูโลสกับสายพันธุ์ *Gluconoacetobacter xylinus* TISTR 893 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.7) พบว่าในช่วง 9 วันแรกของการหมักนั้น ความหนาของชั้นเซลลูโลสที่ผลิตได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (รูปที่ 4.6) เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 14 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เกือบทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงกว่าสายพันธุ์ *Gluconoacetobacter xylinus* TISTR 893 สำหรับค่าแรงเจาะทะลุผ่านโดยใช้เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของเซลลูโลสที่ผลิตได้จากแต่ละสายพันธุ์นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเซลลูโลส น้ำหนักเปียกในช่วง 165.41-209.71 กรัม และน้ำหนักแห้ง 9.10-11.53 กรัม ในวันที่ 14 ของการหมัก (ตารางที่ 4.17)

เชื้อที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการผลิตเซลลูโลสเพื่อการบริโภค ซึ่งมีชื่อเรียกทางการค้าว่า Nata De Coco และเพื่ออุตสาหกรรมการผลิตเซลลูโลสเช่นเดียวกับในต่างประเทศที่หันมาใช้ประโยชน์เพื่ออุตสาหกรรมการผลิตเซลลูโลสกันมาก (Toyosaki และคณะ, 1995) ดังนั้นจึงต้องการเชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงและรวดเร็ว ซึ่งเซลลูโลสที่ได้จากแหล่งนี้มีความบริสุทธิ์สูงและจะช่วยลดมลพิษในขั้นตอนการผลิตเส้นใยเซลลูโลสจากไม้ได้ (Cannonและ Anderson,1991)

บทที่ 6

ข้อสรุป

6.1 การศึกษาอนุกรมวิธาน

พบว่าจากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา ชีวเคมี และระบบยูบิควิโนน รวมทั้งการศึกษา DNA-DNA homology จากเชื้อตัวแทน 142 สายพันธุ์ ของเชื้อทั้งหมด 216 สายพันธุ์ สรุปได้เป็นเชื้อ 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 จำนวน 52 สายพันธุ์ เป็น *Acetobacter pasteuriamus* ซึ่งทนอุณหภูมิได้สูง กลุ่มที่ 2 จำนวน 35 สายพันธุ์ เป็น *A. aceti* โดยเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้มีระบบยูบิควิโนนเป็นชนิด Q-9 กลุ่มที่ 3 จำนวน 12 สายพันธุ์ เป็น *Gluconoacetobacter xylinus* กลุ่มที่ 4 จำนวน 6 สายพันธุ์ เป็น *Gluconoacetobacter liquefaciens* และกลุ่มที่ 5 จำนวน 37 สายพันธุ์เป็น *Gluconobacter* sp. โดยเชื้อทั้งสามกลุ่มหลังนี้มีระบบยูบิควิโนนเป็นชนิด Q-10

6.2 การศึกษาการผลิตกรดและเซลลูโลส

พบว่าเชื้อ 204 สายพันธุ์ สามารถผลิตกรดอะซิติกในช่วง 0.01-1.45 กรัม/100 มิลลิลิตร และ 12 สายพันธุ์สามารถผลิตเซลลูโลสได้ ผลการศึกษาปัจจัยต่างๆ ต่อการผลิตกรดของเชื้อที่คัดเลือก 5 สายพันธุ์คือ *A. pasteuriamus* GR 24-2, OR 56-1, BS 58-2, MG 69-2 และ *A. aceti* SF 18-1 เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน TISTR 1056^{T} และ TISTR 354^{T} พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดได้สูงสุดในอาหารที่เติมเอธานอล 4.0% (v/v) กรดอะซิติก 0.5 หรือ 1.0% (v/v) กรดคาซามิโน 0.5% (w/v) และหมักที่ 30-37 °ซ. โดยเชื้อ OR 56-1 ยังสามารถผลิตกรดได้ที่ 40 °ซ. ด้วย การผลิตเซลลูโลสของเชื้อตัวแทน 6 สายพันธุ์ คือ *Gluconoacetobacter xylinus* BB 150-1, MM 151-1, JF 152-1, BS 153-1, AP154-1 และ LD 155-1 เปรียบเทียบกับ TISTR 893 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวเป็นเวลา 14 วัน ได้ค่าน้ำหนักเปียก 165.41-209.71 กรัม น้ำหนักแห้ง 9.10-11.53 กรัม และค่าเนื้อสัมผัสเป็น 49.65-56.51 นิวตัน ผลการทดสอบด้านความหนาและเนื้อสัมผัสของเซลลูโลสที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

บทที่ 7

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยนี้ พบเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกหลายสปีชีส์กระจายอยู่ในแหล่งผลไม้ ดอกไม้ และวัสดุต่างๆ ซึ่งคัดเลือกได้เชื้อ *Acetobacter pasteurianus* สายพันธุ์ที่ผลิตกรดได้มากและทนอุณหภูมิสูง รวมทั้งเชื้อ *Gluconoacetobacter xylinus* สายพันธุ์ที่ผลิตเซลลูโลสได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการผลิตทางอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามควรมีการแยกเชื้อเพิ่มเติม โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นและรวบรวมจากแหล่งที่แตกต่างกันจะทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์ที่แตกต่างไป และจากผลการศึกษา DNA-DNA homology ของเชื้อ *Gluconobacter* ที่แยกได้ซึ่งพบว่าไม่สามารถระบุว่าเป็นสปีชีส์ใด เชื้อกลุ่มนี้อาจเป็นเชื้อชนิดใหม่ที่ควรศึกษาเพิ่มเติมอีก สำหรับการผลิตกรดอะซิติกของเชื้อสายพันธุ์ที่ทนความร้อนนั้นควรศึกษาการผลิตกรดในถังหมัก (Fermentor) ด้วย อย่างไรก็ตามสามารถนำเชื้อที่แยกได้จากการวิจัยนี้ไปใช้ประโยชน์ในการผลิตน้ำส้มสายชูและวุ้นมะพร้าว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บรรณานุกรม

ดงเดช ลีโทชวลิตร, 2540. สถิติเพื่อการวิจัย. กรุงเทพฯ. ธรรมสาร.

ชินปัญญ์ ปลั่งศิริ, นิศา มหาเอกอนันต์ และศิริพร ศรีมาลัยพร. 2540. การแยกและคัดเลือกอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย. ปริญญานิพนธ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

โชคชัย กิตติเกิดคุณ และเกรียงไกร พิทักษ์ตระกูลศิริ. 2538. การคัดเลือกเชื้ออะซิโตแบคเตอร์สปีชีส์และผลิตเซลลูโลส. ปริญญานิพนธ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณัฐดา วิโรจน์แสงอรุณ และสมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2533. การผลิตน้ำส้มสายชูจากเชื้อ *Acetobacter* species ที่แยกได้จากวัสดุธรรมชาติ. รายงานผลการวิจัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภา โล่ห์ทอง. 2520. น้ำส้มสายชู. ข่าวสารเกษตรศาสตร์ 21(4): 70-75.

เผด็จ วัชรโกมลพันธ์. 2540. อุตสาหกรรมการผลิตกรดอะซิติกในประเทศไทย. ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การจำแนกและการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียกรดอะซิติกและกรดแลคติก, หน้า 1-5. 10-11 มีนาคม 2541 ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2526. อะซิติกแอซิดแบคทีเรีย. ในเอกสารประกอบการสอนเรื่อง อะซิติกแอซิดแบคทีเรีย. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ สุวิมล กีรติพิบูล และอภิสิทธิ์ ศรีอรุณเรืองชัย. 2541. การแยกและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกจากผลไม้. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์)

สมศรี ลีปิพัฒนวิทย์. 2531. การหาสูตรที่เหมาะสมสำหรับทำวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าวแก่. วารสารอาหาร (4): 239-245.

Adams, M.R. 1985. Vinegar : Microbiology of fermented foods. Vol 1. London: Elsevier Applied Science Publishers.

Allgeier, R.J. and Hildebrandt, F.M. 1960. Newer developments in vinegar manufacture. Adv. Appl. Microbiol. 11: 163-182.

Amemura, A., Hashimoto, T., Koizumi, K. and Utamura, T. 1985. Occurrence of extracellular (1→2)-β-D-glucose and (1→2)-β-D-gluco-oligosaccharides in *Acetobacter*. J. Gen. Microbiol. 131: 301-307.

Asai, T. 1968. Acetic acid bacteria classification and biochemical activities. Tokyo: University of Tokyo Press.

Asai, T., Iizuka, H. and Komagata, K. 1964. The flagellaion and taxonomy of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter* with reference to the existence of intermediate strains. J.Gen. Appl.Microbiol. 10(2): 95-126.

Ationu, A., Patterson, J.D.E., Todd, J.R. and Wood, B.J.B. 1988. Production of acetic acid in packed bed fermenters. Biotechnol. Let. 10(9): 671-676.

Aurand, L.W., Singleton, J.A., Bell, T.A. and Etchells, J.L. 1966. Volatile components in the vapors of natural and distilled vinegar. J. Food Sci. 31(2): 172-173.

Bulygina, E.S., Gulikova, O.M., Dikanskaya, E.M., Netrusov, A.K., Tourova, T.P. and Chumakov, K.M.1992. Taxonomic studies of the genera *Acidomonas*, *Acetobacter* and *Gluconobacter* by 5S ribosomal RNA sequencing. J. Gen. Microbiol. 138: 2283-2286.

Cannon, R.E. and Anderson, S.M. 1991. Biogenesis of bacterial cellulose. Crit. Rev. Microbiol. 17(6): 435-447.

Carigliano, M.C. 1982. A selective medium for the isolation and differentiation of *Gluconobacter* and *Acetobacter*. J. of Food Sci. 47: 1038-1039.

Casida, L.E. 1968. Industrial microbiology. New York: John Wiley and Sons.

Collin, M.D. and Jones, D. 1981. A note on the separation of natural mixtures of bacterial ubiquinones using reverse phase partition thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography. J. Appl. Bacteriol. 51: 129-134.

Colvin, J.R. and Beer, M. 1960. The formation of cellulose microfibrils in suspensions of *Acetobacter xylinum*. Can. J. Microbiol. 6: 631-637.

Colvin, J.R., Chene, L., Sowdeu, L.C. and Takai, M. 1977. Purification and properties of a soluble polymer of glucose from cultures of *Acetobacter xylinum*. Can. J. Biochem. 55: 1057-1063.

Conner, H.A. and Allqeier, R.J. 1976. Vinegar : Its history and development. Adv. Appl. Microbiol. 20: 81-133.

Cowan, S.T. 1993. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge: Cambridge University Press.

De Jesus, E.G., Andres, R.M., and Magno, E.T. 1971. A study on the isolation and screening of microorganisms for production of diverse-textured nata. Phil. J. Sci. 100(1): 41-49.

De Ley, J. and Frateur, J. 1974. The genus *Gluconobacter* and the genus *Acetobacter* : Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Baltimore: Willams and Wilkins.

De Ley, J., Gillis, M. and Swings, J. 1984. Acetobacteriaceae : Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Baltimore: Willams and Wilkins.

DeMan, J.M., DeMan, L. And Gupta, S. 1986. Texture and microstructure of soybean curd (tofu) as affected by different coagulants. Food Microstructure. 5: 83-89.

Entani, E., Ohmori, S., Masai, H. and Suzuki, K. 1985. *Acetobacter polyoxygenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. J. Gen. Appl. Microbiol. 31: 475-490.

Ezaki, T., Hashimoto, Y., and Yabuuchi, E. 1989. Fluorometric DNA-DNA hybridization in microdilution wells as an alternation to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:224-229.

Forbes, L. 1981. Rapid flagella stain. J. Clin. Microbiol. 13: 807-809.

Gibbs, B.M. and Shapton, D.A. 1968. Identification method for mircrobiologist. New York: Academic Press.

Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B. Janssens, D., Kroppenstedt, R.M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S., Dobereiner, J. and De Ley, J. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. Int. J. Syst. Bacteriol. P.361-364.

Gillis, M. and De Ley, J. 1980. Intra- and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. Int. J. Syst. Bacteriol. 30 (1): 7-27.

Gossele, J., and Swings, J. 1985. Identification of a nata-producing bacterium as *Acetobacter hansenii*. Phil. J. Sci. 114 (3-4): 179-182.

Gossele, J., Swings, J., and De Ley, J. 1980. A rapid, simple and simultaneous detection of 2-keto-, 5-keto- and 2,5-diketogluconic acid by thin layer chromatography in culture media of acetic acid bacteria. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C1: 178-181.

Gossele, F., Swings, J., Kerster, Pauwels, P. and De Ley, J. 1993. Numerical analysis of phenotypic Features and protein gel electrophoregrams of a wide variety of Acetobacter strains. Proposal for the improvement of the taxonomy of the genus *Acetobacter* Beijerinck 1898, 215. System. Appl. Microbiol. 4: 338-368.

Gossele, F., Swings, J., Kersters, K., and De Ley,J. 1983. Numerical analysis of phenotypic features and protein gel electropherograms of *Gluconobacter* Asai 1935 emend. mut. char. Asai, Iizuka, and Komagata 1964. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 65-81.

Helrich, K., ed. 1990. Official methods of analysis: Association of official analytical chemists. 2 Vols. 15th ed. Washington D.C.: Association of Official Analytical Chemists.

Hilf, R. and Castano, F.F. 1958. Quantitative determination of reducing sugars and a sugar acid by hydroxamic acid formation. Analytical Chemistry. 30(9): 1538-1540.

Holt, J.G., ed. 1994. *Acetobacter*: Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore: The Williams and Wilkins.

Hromatka, O. and Ebner, H. 1959. Vinegar by submerged oxidative fermentation. Ind. Eng. Chem. 51(10): 1270-1280.

Hucker, G. J. and Conn, H.J. 1923. Method of gram staining : Technical bulletin 93. New York: Ithaca.

Jesus, E.G.D., Andres, R.M. and Magno, E.T. 1971. A study on the isolation and screening of microorganisms for production of diverse-textured NATA. Phil. J. Sci. 100(1): 41-53.

Komagata, K. 1975. In : Classification and Identification of Microorganisms. Tokyo: University of Tokyo Press.

Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H., and Yoshinaga, F. 1997. Effect of oxygen and carbon dioxide on bacterial cellulose production by Acetobacter in aerated and agitated culture. J. Ferment. Bioeng. 84:124-127.

Leifson ,E. 1954. Antonie Van Leewenhock. J. Microbial. Serol. 20: 102.

Masaoka, S., Ohe, T. And Sakota, N. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. J. Ferment. Bioeng. 75(1): 18-22.

Mason, L.M. and Claus, G.W. 1989. Phenotypic characteristics correlated with deoxyribonucleic acid sequence similarities for three species of *Gluconobacter* : *G. oxydans* (Hanneberg 1987)De Ley 1961, *G. frateurii* sp. nov., and *G. asaii* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 174-184.

Micales, B.K., Johnson, J.L. and Clans, G.W. 1985. Deoxyribonucleic acid homologies among organisms in the genus *Gluconobacter*. Int. J. Syst. Bacteriol. 35(1): 79-85.

Minakami, H., Entani, E., Tayama, K., Fujiyama, S. and Masai, H. 1984. Isolation and characterization of a new polysaccharide producing *Acetobacter* sp. Agric. Biol. Chem. 48(1): 2405-2414.

Mori,H. and Harada,T. 1973. Nutrition of *Acetobacter rancens* S3 and F11 isolated from tanks for vinegar production. Agri. Biol. Chem. 27(1): 139-144.

Nanba, A., Tamura, A. and Nagai, S. 1984. Synergistic effects of acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp. J. Ferment. Technol. 62(6): 501-505.

Nickol, C.B. 1976. Vinegar : Microbial technology. 2 Vols. New York: Academic Press.

Ohmori, S., Masai, H., Arima, K. and Beppu, T. 1980. Isolation and identification of acetic acid bacteria for submerged acetic acid fermentation at high temperature. Agric. Biol. Chem. 44(12): 2901-2906.

Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N. and Adachi, O. 1997. Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperature. Biosci. Biotech. Biochem. 61(1): 138-145.

Sasazaki, H., Lumyong, S., Suto, M., Yokota, A., and Tomita, F. 1997. Cellulose-producing bacteria isolated from fruits samples in Thailand and Japan. The 9th annual meeting of the Thai society for biotechnology. Suranaree University. 9: 50.

Savidge, R.A. and Colvin, J.R. 1985. Production of cellulose and soluble polysaccharides by *Acetobacter xylinum*. Can. J. of Microbiol. 3: 1019-1025.

Sievers, M., Gaberthuel, C., Boesch, C., Ludwig, W. and Teuber, M. 1995. Phylogenetic position of *Gluconobacter* species as a coherent cluster separated from all Acetobacter species on the basis of 16S ribosomal RNA sequences. FEMS Microbiol. Let. 126: 123-126.

Sievers, M., Ludwig, W. and Teuber, M. 1994. Revival of the species *Acetobacter methanolicus* (ex Uhlig et al. 1986) nov. rev. System. Appl. Microbiol. 17: 352-354.

Sievers, M., Sellmer, S. and Teuber, M. 1992. *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in central europe. System. Appl. Microbiol. 15: 386-392.

Stackebrandt, E. 1998. Validation list No. 64. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 327-328.

Swings, J. 1992. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* : Prokaryotes. 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

Swings, J., De Ley, J. and Gillis, M. 1984. Pseudomanadaceae : Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Baltimore: Willams and Wilkins.

Tamaoka, J. 1994. Determination of DNA base composition. In Chemical methods in Prokaryotic systematics. Edited by Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G. John Wiley and Sons Ltd. 463-470.

Tanasupawat, S., Ezaki, T., Suzuki, K-I., Okada ,S., Komagata, K., and Kozaki, M.1992. Characterization and identification of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol. 38:121-134.

Tayama, K., Minakami, H., Entani, E., Fujiyama, S. and Masai, H. 1985. Struture of and acidic polysaccharide from *Acebacter* sp. NBI 1022. Agric. Biol. Chem.49(4): 959-966.

Theeragool, G., Lotong, N., Matsushita, K., and Adachi, O. 1997. Characterization of thermostable alcohol dehydrogenase from thermotolerant acetic acid bacteria. The 9th annual meeting of the Thai society for biotechnology. Suranaree University. 9: 62.

Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto., Matsuoka, M., Tsuchida, T. and Yoshinaga, F. 1995. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. Biosci. Biotech. Biochem. 59(8): 1498-1502.

Uhlig, H., Karbaum, K. And Steudei, A. 1986. *Acetobacter methanolicus* sp. nov., an acedophilic facultatively methylotrophic bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 36(2): 317-322.

Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K. and Komagata, K. 1989. *Acidomonas methanolica* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39(1): 50-55.

Valla, S. and Kjosbakken, J. 1981. Isolation and characterization of a new extracellular polysaccharide from a cellulose negative strain of Acetobacter xylinum. Can. J. Microbiol. 27: 599-603.

Watanabe, T., Izaki, K. and Takahashi, H. 1982. New polyic antibiotic active against gram positive and negative bacteria. J. Antibiotics. 35(9): 1141-1147.

Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Kichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. and Truper, H.G. 1987. Report of the *Ad Hoc* Committee on reconciliation of approaches bacterial systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:463-464.

Yamada, Y., Aida, K. and Uemura, T. 1968. Distribution of ubiquinone 10 and 9 in acetic acid bacteria and its relation to the classification of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*, espectially of so-called intermediate strains. Agr. Biol. Chem. 32(6): 786-788.

Yamada, Y., Aida, K. and Uemera, T. 1969a. Ubiquinone of acetic acid bacteria and its relation to Classification of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*, espectially of the so-called intermediate strains. J. Gen. Appl. Microbiol. 15: 181-196.

Yamada, Y., Nakazawa, E, Nozaki, A. and Kondo, K. 1969b. Characterization of *Acetobacter xylinum* by ubiquinone system. Agr. Biol. Chem. 33(1): 1659-1661.

Yamada, Y., Nakazawa, E, Nozaki, A. and Kondo, K. 1976a. Characterization of *Acetobacter xylinum* by ubiquinone system. J. Gen. Appl. Microbiol. 22: 285-292.

Yamada, Y., Okada, Y. and Kondo, K. 1976b. Isolation and characterization of polarly flagellated intermediate strains in acetic acid bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 22: 237-245.

Yamada, Y., Nunoda, M., Ishikawa, T., and Tahara, Y. 1981. The cellular fatty acid composition in

Yamada, Y. 1983. *Acetobacter xylinum* sp. nov., nom. rev., for the cellulose-forming and cellulose-less, acetate-oxidizing acetic acid bacteria with the Q-10 system. J. Gen. Appl. Microbiol. 29: 417-420.

Yamada, Y., Akita, M., Koda, T., Tahara, Y. and Yoshioka, H. 1983. Elevation of *Acetobacter aceti* subsp. *liquefaciens* to *Acetobacter liquefaciens* sp. nov. comprising the peritrichously flagellated intermediate in acetic acid bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 29: 327-333.

Yamada, Y. and Kondo, K. 1984. *Gluconoacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone 10 in the genus *Acetobacter*. J. Gen. Appl. Microbiol. 30: 297-303.

Yamada, Y., Hoshino, K. and Ishikawa, T. 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S Ribosomal RNA:the evaluation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. Biosci. Biotech. Biochem., 61(8): 1244-1251.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

1. สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเหลว GEY

กลูโคส	20.0	กรัม
เอธานอล[1/]	50.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

ปรับให้มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) เป็น 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 1 นอร์มอล นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดัน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

[1/] เมื่ออาหารเย็นตัวแล้วเติมเอธานอล 95 % โดยวิธีปราศจากเชื้อ

1.2 อาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$

กลูโคส	20.0	กรัม
เอธานอล[2/]	50.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	3.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 1.1

[2/] เติมเอธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ก่อนเทลงในจานเพาะเชื้อ

1.3 อาหารวุ้น GYPG

กลูโคส	10.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
เปปโตน	10.0	กรัม
กลีเซอรอล	10.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	3.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

1.4 อาหารเหลว GYPG

กลูโคส	10.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
เปปโตน	10.0	กรัม
กลีเซอรอล	10.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

1.5 อาหารเหลว EY

เอธานอล	40.0	มล.
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

1.5.1 อาหารเหลว Y

ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

1.5.2 อาหารเหลว EAY

เอธานอล (95%)	40.0	มล.
อะซิติกแอซิด (99.8%)	10.0	มล.
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

(สำหรับเชื้อสายพันธุ์ SF 18-1 และ GR 24-2 จะเติมกรดอะซิติกปริมาตร 5.0 มล. เท่านั้น)

1.5.3 อาหารเหลว EACY

เอธานอล (95%)	40.0	มล.
อะซิติกแอซิด (99.8%)	10.0	มล.
กรดคาซามิโน	1.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

1.6 อาหารวุ้นสูตรน้ำมะพร้าว

แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
เอธานอล	50.0	มล.
ซูโครส	50.0	กรัม
น้ำมะพร้าวแก่	1000.0	มล.

ปรับให้มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) เป็น 4.5 ด้วย กรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 1 นอร์มอล

1.7 อาหารเหลวสูตรน้ำมะพร้าว

แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.3	กรัม
เอธานอล	60.0	มล.
ซูโครส	50.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำมะพร้าวแก่	1000.0	มล.

ปรับให้มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) เป็น 4.5 ด้วย กรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 1 นอร์มอล

1.8 อาหารเหลว GGYPA

กลูโคส	5.0	กรัม
กลีเซอรอล	5.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
โพลีเปปโตน	5.0	กรัม
กรดอะซิติก[3/] (99.8%)	3.0	มล.
น้ำกรอง	1000.0	มล.

[3/] เมื่ออาหารเย็นลงแล้วเติมกรดอะซิติก 99.8 % โดยวิธีปราศจากเชื้อ

1.9 อาหารเหลว GGYPE

กลูโคส	5.0	กรัม
กลีเซอรอล	5.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
โพลีเปปโตน	5.0	กรัม
เอธานอล[4/] (95%)	8.0	มล.
น้ำกรอง	1000.0	มล.

[4/] เมื่ออาหารเย็นลงแล้วเติมเอธานอล 95 % โดยวิธีปราศจากเชื้อ

1.10 อาหารเหลว SBYP

โซเดียมอะซิเตท ($CH_3COONa.3H_2O$)	2.0	กรัม
โบรโมไทมอลบูล	0.002	% w/v
ผงสกัดยีสต์	2.0	กรัม
เปปโตน	3.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

ปรับให้มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น (pH) 6.4 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1 นอร์มอล

1.11 อาหารวุ้น CY

แคลเซียมแลคเตท ($(CH_3CHOH.COO)2Ca.H_2O$)	10.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	10.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

ปรับให้มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น (pH) 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 1 นอร์มอล

1.12 อาหารเหลว GY

กลูโคส	20.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

1.13 อาหารเหลว YG

ผงสกัดยีสต์	3.0	กรัม
กลูโคส	30.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

1.14 อาหารวุ้น MYP

แมนนิทอล	25.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
เปปโตน	5.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.15 อาหารวุ้น MGYP

แมนนิทอล	20.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
เปปโตน	5.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	กรัม

1.16 อาหารวุ้น GGY

กลีเซอรอล	10.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

1.17 อาหารเหลว CY

แคลเซียมแลคเตท	10.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	1.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

1.18 อาหารเหลว CBY

แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	10.0	กรัม
โบรโมครีซอล เพอร์เพิล	0.02	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ ดี-กลูโคส แอล-อะราบิโนส ดี-ฟรุกโตส ดี-กาแลคโตส แมนนิทอล ดี-แมนโนส กลีเซอรอล ซูโครส มอลโตส ดี-ซอร์บิทอล เมลิไบโอส ดี-เซลโลไบโอส แป้ง ดี-ไซโลส มอลโตส ดี-เมเลไซโตส แอล-ราฟฟิโนส เอสคูลิน ดี-ไรโบส ซาลิซิน แอล-แรมโนส แอล-ซอร์โบส ดี-ทรีฮาโลส เอธานอล เมธานอล และ ซอร์บิทอล

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °ซ. ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อชนิดใช้เตาแก๊ส เป็นเวลา 10 นาที แล้วรีบนำมาลดอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยแช่ในน้ำเย็น

1.19 อาหารวุ้น GYC

กลูโคส	30.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	20.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

1.20 อาหารวุ้น GG

กรดกลูตามิค	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.20	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.1	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

1.21 อาหารวุ้น โฮเยอร์-เฟรเทอร์ (Hoyer-Frateur agar)

เอธานอล	30.0	มล.
ไดแอมโมเนียมซัสเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.1	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.9	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.25	กรัม
เฟอร์รัสคลอไรด์ ($FeCl_3$)	0.005	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

1.22 อาหารเหลว GEPY

กลูโคส	1.5	กรัม
เอธานอล	15.0	มล.
เปปโตน	10.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	8.0	กรัม
น้ำกรอง	1000.0	มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.23 อาหารเหลว GG

กลูโคส	1.0	กรัม
กลีเซอรอล	20.0	มล.
น้ำกรอง	1000.0	มล.

2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acid) ปรับปรุงจาก Helrich, 1990.

สารเคมี

1.) น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เตรียมโดยนำน้ำกลั่นมาต้มเดือด 20 นาที

2.) สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มอล เตรียมจากโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัมที่เติมน้ำกลั่นปลอดคาร์บอนไดออกไซด์จนครบ 1 ลิตร เก็บในขวดแก้วที่กันคาร์บอนไดออกไซด์และเป็นแก้วทนด่าง ก่อนใช้นำมาหาความเข้มข้นมาตรฐานก่อน

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ทำโดยชั่งโปแตสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต ($KHC_8H_4O_4$) (อบ 2 ชั่วโมงที่ 120 ซ แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง) อย่างละเอียดประมาณ 0.3 กรัม เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 90-100 มล. เมื่อโปแตสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลตละลายจึงเติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน (phenolpthalein) 3 หยดแล้วไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ความเข้มข้นมาตรฐานคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (นอร์มอล)} = \frac{\text{กรัมโปแตสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต} \times 1,000}{\text{มล. ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล} \times 204.229}$$

3.) สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ชั่งฟีนอฟธาลีน 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95% ปริมาตร100 มล.

สำหรับวิธีวิเคราะห์ ให้นำตัวอย่าง 10 มล. เติมสารละลายฟีนอล์ฟธาลีน 3 หยดแล้วไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งถึงจุดยุติเห็นเป็นสีชมพู คำนวณปริมาณกรดเป็นกรดอะซิติก ตามสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (กรัมต่อ 100 มล.)} = \frac{N \times V \times 60.1 \times 100}{1,000 \times 10}$$

โดยกำหนดให้ N = ความเข้มข้นละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

V = ปริมาตรมิลลิลิตรของละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

2.2 การย้อมสีเชื้อโดยวิธีแกรม (Gram's stain) ดัดแปลง โดย Hucker, 1923

สารเคมี

1.) แกรมคริสตัลไวโอเลต (Gram's crystal violet) ประกอบด้วย

สารละลาย A :	คริสตัลไวโอเลต	2.0	กรัม
	เอธานอล (95%)	20.0	มล.
	ละลายคริสตัลไวโอเลต ในเอธานอล		
สารละลาย B :	แอมโมเนียมออกซาเลต	0.8	กรัม
	น้ำกลั่น	80.0	มล.

ละลายแอมโมเนียมออกซาเลต ในน้ำกลั่น ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน

2.) แกรมไอโอดีน (Gram's iodine) ประกอบด้วย

ไอโอดีนคริสตัส	1.0	กรัม
โปแตสเซียมไอโอไดด์	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มล.

ผสมไอโอดีนคริสตัส และโปแตสเซียมไอโอไดด์ในโกร่ง บดให้เข้ากัน ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นทีละน้อยจนครบ 300 มล. แล้วผสมให้เข้ากัน

3.) แกรมซัฟฟรานิน (Gram's safranin) ประกอบด้วย

ซัฟฟานิน	0.25	กรัม
เอธานอล (95%)	10.00	มล.
น้ำกลั่น	100.00	มล.

ละลายซัฟฟานินใน เอธานอล เติมน้ำกลั่นแล้วผสมให้เข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรอง

วิธีการย้อมแกรม

- กระจายเชื้อบนสไลด์ ทำให้แห้งในอากาศแล้วผ่านเปลวไฟเพื่อตรึง (fix) เซลล์
- ย้อมด้วยสีแกรมคริสตัลไวโอเลต 1 นาที
- ล้างด้วยน้ำ
- ย้อมด้วยแกรมไอโอดีน 1 นาที
- ล้างสีออกโดยใช้ 95% เอธานอล สังเกตสีแกรมคริสตัลไวโอเลตที่ถูกชะออกพอเริ่มจางหยุดปฏิกิริยาโดยการจุ่มลงในน้ำ
- ย้อมด้วยสีซัฟฟรานิน 30 วินาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้ง
- ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัว x100

2.3 การย้อมแฟลกเจลลา

สารเคมี

1.) สีย้อมแฟลกเจลลา

องค์ประกอบ A ประกอบด้วย

เบสิคฟุคซิน (Basic fuchsin)	0.4	กรัม
แอซิดฟุคซิน (Acid fuchsin)	0.2	กรัม
กรดแทนนิค	0.2	กรัม
อะลูมิเนียมแอมโมเนียมซัลเฟต ($Al_2(SO_4)_3.(NH_4)_2SO_4.24\ H_2O$	0.5	กรัม

องค์ประกอบ B ประกอบด้วย

95% เอธานอล	2.0	มล.
กลีเซอรอล	0.5	มล.
ทริส บัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 7.6	7.5	มล.

นำองค์ประกอบทั้งสองมาผสมกันในหลอดฝาเกลียว เขย่าด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 2,500 รอบต่อนาที 2 นาที แล้ววางทิ้งไว้ 2 นาที ควรเตรียมใหม่ๆ ก่อนใช้

2.) แกรมคริสตัลไวโอเลต (Gram's crystal violet)

วิธีการย้อม

- เตรียมซัสเพนชั่น (Suspension) เชื้อแล้วหยดลงบนสไลด์ และปล่อยให้แห้งในอากาศ
- ย้อมด้วยสีที่เตรียม 2 นาที
- ล้างด้วยน้ำ
- ย้อมด้วยแกรมรมคริสตัลไวโอเลต 1 นาที ล้างด้วยน้ำแล้วซับให้แห้ง
- ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัว x100

2.4 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ระดับความเข้มข้น 3 % ประกอบด้วย

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาในตู้เย็น

2.5 การทดสอบกรดกลูโคนิค

สารเคมี

กรดไฮโดรคลอริค	6.0	นอร์มอล
โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	1.1	% w/v ในน้ำกลั่น
ไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ ($NH_2OH.HCl$)	1.4	% w/v ในเมธานอล

นำโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ในอัตราส่วน 1:1 มาผสมกันก่อนใช้

วิธีการทดสอบ

- นำอาหารเลี้ยงเชื้อตัวอย่าง 2-3 มล. ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 มล.
- เติมกรดไฮโดรคลอริค 0.75 มล.
- ทำให้แห้งบนเพลทให้ความร้อน
- เติมสารละลายผสมระหว่างโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และไฮดรอกซีลามีน ไฮโดรคลอไรด์ 5 มล.
- ตั้งทิ้งไว้ก่อนดูผลเป็นเวลา 10 นาที

2.6 การทดสอบกรดคีโตกลูโคนิค

สารเคมี

เอทธิลอะซิเตท : กรดฟอร์มิก : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 18 :1 : 3 : 4

สารละลายออร์โทฟีนิลลีนไดอะมีน ทำการเตรียมโดยละลาย ออร์โทฟีนิลลีนไดอะมีน 0.5 กรัม ในน้ำ 3.75 มล. แล้วเติมด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 12 นอร์มอล 0.81 มล. ควรเตรียมก่อนใช้

วิธีการทดสอบ

- ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 1-2 สัปดาห์
- นำเซลล์ออกโดยการเซนตริฟิวจ์ที่ 11,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใส (supernatant) 10 ไมโครลิตรมาสปอต (spot) ลงบน Cellulose TLC plastic
- ทำการอีลูท (Elute) 3 ครั้งใน TLC chamber โดยมีเอทธิลอะซิเตท : กรดฟอร์มิก : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 18 :1 : 3 : 4 เป็นส่วนเคลื่อนที่ (Mobile phase)
- ปล่อยให้แห้งในอากาศอุณหภูมิประมาณ 25 °ซ.
- พ่นด้วย ออร์โทฟีนิลลีนไดอามีน
- ทำให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 105 °ซ. เป็นเวลา 2-3 นาที
- ดูสีที่ปรากฏบนแผ่น TLC ทั้งภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต และแสงปกติดังตาราง ก.1

ตารางที่ ก.1 ลักษณะสีที่ปรากฏภายใต้แสงปกติ และรังสีอัลตร้าไวโอเลตบนโครมาโตรแกรม

สารประกอบ	สีภายใต้แสงปกติ		สีภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต	
	ภายหลังการอบ 2-3 นาที	ภายหลังการอบ 16 ชม.	ภายหลังการอบ 2-3 นาที	ภายหลังการอบ 16 ชม.
กลูโคส	เทา (gray)	เทา (gray)	ฟ้า (blue)	น้ำตาลแดง (brown-red)
กรด 2-คีโตกลูโคนิค (2-ketogluconic acid)	เหลือง (yellow)	ม่วง (violet)	เหลืองเรืองแสง (yellow fluorescence)	ฟ้าเรืองแสง (blue fluorescence)
กรด 5-คีโตกลูโคนิค (5-ketogluconic acid)	ฟ้าอ่อน (light-blue)	เขียวฟ้า (blue-green)	ฟ้าเข้ม (dark blue)	เขียว (green)
กรด 2, 5-ไดคีโตกลูโคนิค (2, 5-diketogluconic acid)	เขียว (green)	เหลือง (yellow)	เหลืองเรืองแสง (yellow fluorescence)	เหลืองเรืองแสง (yellow fluorescence)

ที่มา : Gossele และคณะ (1980)

2.7 การเตรียมสารละลายเฟห์ลิง (Fehling's solution)

สารเคมี

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	34.64	กรัม
โซเดียมโปแตสเซียมทาเทรต	173.00	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	50.00	กรัม

- นำคอปเปอร์ซัลเฟต มาละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 500 มล.
- นำโซเดียมโปแตสเซียมทาเทรตและโซเดียมไฮดรอกไซด์ มาละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 500 มล. นำสารละลายทั้งสองผสมกันในอัตราส่วนที่เท่ากันก่อนนำมาใช้

2.8 การทดสอบการสร้างอะซิติลเมทธิลคาร์บินอลจากแคลเซียมแลคเตท

สารเคมี

แอลฟาแนพทอล	5.0	% ใน 95% เอธานอล
โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์	40.0	กรัม มาละลายในน้ำกลั่น 75

มล. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติม ครีเอติน 0.3 กรัม แล้วเขย่าให้เข้ากัน

วิธีการทดสอบ

- ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CY เป็นเวลา 7 วัน ที่ 30 °ซ.
- เติมแอลฟาแนปทอล 0.5 มล. แล้วเขย่าผสม
- เติมโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 มล. แล้วเขย่าผสม
- ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที ถ้าสามารถผลิตสารอะซิติลเมธิลคาร์บินอลได้จะให้เป็นสีชมพูถึงแดง

2.9 การวิเคราะห์ระบบยูบิควิโนนของเชื้อ จาก Yamada และคณะ (1968)

สารเคมี

- คลอโรฟอร์ม (2) : เมธานอล (1)
- อะซิโตน
- เบนซีน
- เอธานอล 95% (5) : เอทธิลอะซิเตท (3) : น้ำกลั่น (1)
- โปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต ($KMnO_4$) 0.3% w/v ในน้ำกลั่น
- ยูบิควิโนนชนิด คิว-9 และ คิว-10 (Ubiquinone Q-9 and Q-10)

วิธีการ

- ทำการเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้เซลล์ (Intact cell)
- ทำการเซนตริฟิวจ์เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีเสียก่อน แยกส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อออก (Supernatant) ส่วนกรณีใช้เซลล์แห้ง จะต้องนำเซลล์ที่ได้มาทำให้แห้ง ด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer)
- นำเซลล์ที่ได้มาสกัดสารยูบิควิโนนด้วย คลอโรฟอร์ม (2) : เมธานอล (1) ปริมาตร 100 มล. โดยใส่ในฟลาสก์ ขนาด 250 มล. แล้วเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบหมุน (Rotary shaker) ประมาณ 30 นาที
- กรองเซลล์ที่ผ่านการสกัดสารออก แล้วนำส่วนของตัวทำละลายไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 °ซ.
- ใช้อะซิโตน ปริมาณเล็กน้อยเพื่อละลายสารยูบิควิโนนภายในฟลาสก์แล้วนำไปสปอต (Spot) ลงบนซิลิกาเจล แกลสเพลท (Silica gel glass plate) (20x20 cm, 0.5 mm, E. Merck, silica gel $60F_{254}$, Art 5744) เปรียบเทียบกับสารยูบิควิโนนมาตรฐาน
- นำ TLC ที่สปอตแล้ว develope ใน ที แอล ซี แชมเบอร์ (TLC chamber) โดยใช้ เบนซีนเป็นส่วนเคลื่อนที่
- ทำให้แห้ง แล้วตรวจสอบแถบสีเหลือง (Yellow band) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ค่า R_f ประมาณ 0.25

- ขูดแถบสีเหลืองออก แล้วละลายในอะซิโตนปริมาตรเล็กน้อยและกรองเอาสารละลายเพื่อทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน
- ทำการทำสอบว่าสารยูบิควิโนนที่ได้เป็นชนิดใด โดยนำตัวอย่างและสารยูบิควิโนนมาตรฐานทั้งชนิด คิว-9 และ คิว-10 มาสปอตลงบน รี เวอร์ส เปเปอร์ เฟส ทินเลย์เยอร์โครมาโตรกราฟี (Reverse-phase paper chromatography เบอร์ 50 ของบริษัท Toyo Roshi ซึ่งได้ผ่านการทำให้ชืมซาบ (Impregnate) ด้วย ซิลิโคน 3% w/v ในคลอโรฟอร์ม)
- นำ TLC ที่สปอตแล้วไป develope ใน ที แอล ซี แชมเบอร์ (TLC chamber) โดยใช้เอธานอล 95% (5) : เอทธิลอะซิเตท (3) : น้ำกลั่น (1) เป็นส่วนเคลื่อนที่
- ทดสอบชนิดของยูบิควิโนนโดยนำแผ่นโครมาโตรกราฟีจุ่มลงในสารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต 0.3% เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เห็นจุดได้ชัดเจนขึ้นแล้วล้างออกด้วยน้ำ แล้วผึ่งให้แห้ง

2.10 การศึกษา DNA-DNA hybridization

สารเคมี

- สารละลาย saline-EDTA (S-EDTA) ที่มี pH 8.0 โดยการเตรียมโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 โมลลาร์ ผสมกับเอธิลลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิด (EDTA) ที่ระดับความเข้มข้น 0.10โมลลาร์ในอัตราส่วนที่เท่ากันทำการปรับ pH โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ชนิดเม็ดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้
- ทริส-บัฟเฟอร์ (Tris-buffer) ที่มี9.0 โดยการเตรียมทริส (Tris) ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 โมลลาร์ ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 โมลลาร์ ในอัตราส่วนที่เท่ากัน ทำการปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริค (HCl) เป็น 9.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้
- สารละลาย 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate) ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- SSC (Sodium chloride sodium citrate solution) ที่มีค่า pH 7.0 โดยการเตรียมโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 โมลลาร์ ผสมกับโซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) ที่ระดับความเข้มข้น 0.015 โมลลาร์ ในอัตราส่วนที่เท่ากันปรับ pH ให้ได้ 7.0
- ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-hydrochloride) ที่มีค่า pH 7.5 โดยการเตรียมทริส-ไฮโดรคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 โมลลาร์

- การเตรียมเอนไซม์ RNase เตรียมโดยชั่งเอนไซม์ RNase A 1 มก./มล. ของทริส-ไฮโดรคลอไรด์ จากนั้นให้ความร้อนที่ 90 °ซ. เป็นเวลา 5-10 นาทีเพื่อทำลาย DNase แล้วทำให้เย็นทันทีในน้ำแข็ง แล้วเติม RNase T1 400 ยูนิต (RNase T_1 1 ไมโครลิตร มี 100 ยูนิต)
- สารละลายเดนฮาร์ท 100 เท่า (100 Denhardt solution) ประกอบด้วย

โบวิน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin) (Fraction V)	2 %
โพลีไวนิลไพโรลิโดน (Poly vinylpyrrolidone)	2 %
ฟิคอล 400 (Ficoll 400)	2 %

- ดีเอ็นเอ ของแซลมอน สเปร์ม ความเข้มข้น 10 มก. / มล. (10 มก. / มล. Salmon sperm DNA) เตรียมโดยนำ Salmon sperm DNA 10 มก. ละลายในสารละลายผสมทริส และ EDTA ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร (สารละลายทริส ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ผสมสารละลาย EDTA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมล pH 7.6) นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาทีแล้วทำให้เย็นทันทีในน้ำแข็ง แล้วนำไปโซนิเคท (Sonication) เป็นเวลา 3 นาที
- สารละลายพรีไฮบริไดเซชั่น (Prehybridization solution) ประกอบด้วย

สารละลายเดนฮาร์ท 100 เท่า	5	มล.
ดีเอ็นเอ ของแซลมอน สเปร์ม ความเข้มข้น 10 มก. / มล.	1	มล.
20 SSC	10	มล.
ฟอร์มาไมด์ (Formamide)	50	มล.
น้ำกลั่น	34	มล

- สารละลายไฮบริไดซ์ (Hybridization solution) ประกอบด้วย

สารละลายพรีไฮบริไดเซชั่น	100	มล.
เด็กแตรน ซัลเฟต (Dextran sulfate)	5	กรัม

- สายละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (2 PBS) ประกอบด้วย

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	2.3	กรัม
โปรแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.4	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	16.0	กรัม
โปรแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.4	กรัม

- สารละลายที่ 1 (Solution 1) ประกอบด้วย

โบวิน ซีรัม อัลบูมิน (Fraction V)	0.25	กรัม
ไทรตอน เอ็กซ์-100 (Triton X-100)	50	ไมโครลิตร
PBS	5	มล.

- สารละลายที่ 2 (Solution 2) ประกอบด้วย

สเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส (Streptavidin-peroxidase)	10	ไมโครลิตร
สารละลายที่ 1 (Solution 1)	10	มล.

- สารละลายที่ 3 (Solution 3) ประกอบด้วย

3,3′,5,5′-เตตระเมธิลเบนซิดีน (3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine : TMB)	100	ไมโครลิตร
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.3% (H_2O_2)	100	ไมโครลิตร
กรดซิตริก 0.1 โมลล่าร์ + ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Na_2HPO_4 buffer) 0.2 โมลล่าร์ (6.2)	5	มล.

วิธีการ

<u>การสกัดดีเอ็นเอ และทำให้บริสุทธิ์</u>

- เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว GEPY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.22) ปริมาตร 400 มล. ใน ฟลาสค์ขนาด 1,000 มล. บ่มที่ 30 ซ. เป็นเวลา 24 ชม.หลังจากนั้นเก็บเซลล์โดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °ซ.
- ล้างเซลล์ของเชื้อด้วยสารละลาย saline-EDTA
- เติมเอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme) 10 มก. เพื่อทำให้เซลล์แตก โดยบ่มไว้ที่ 37 °ซ. เป็นเวลาประมาณ 30-60 นาที
- เติม ทริส-บัฟเฟอร์ (Tris-buffer) ที่มี pH 9.0 ประมาณ 6-8 มล. และสารละลาย 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate) ประมาณ 1-2 หยด เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่ 60 °ซ. เป็นเวลา 10 นาที
- เติม ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (Phenol-Chloroform) ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 5 มล. แล้วทำการเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลาประมาณ 30 นาที ซึ่งฟีนอลเป็นตัวที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ ส่วนคลอโรฟอร์มเป็นตัวแยกโพลีแซคคาไรด์ออกได้ดี
- จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °ซ.
- ดูดสารละลายส่วนบน ซึ่งเป็นดีเอ็นเอใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่แล้วเติมฟีนอล-คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 5 มล. แล้วทำการเขย่าให้เข้ากันจากนั้นนำไปเซนตร์ฟิวจ์ ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °ซ.
- นำสารละลายดีเอ็นเอส่วนบนมาทำการการตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยใช้ เอธานอล 95% ซึ่งแช่แข็งไว้

- ม้วน (Spool) สายดีเอ็นเอ โดยใช้แท่งแก้วสะอาด ล้างดีเอ็นเอที่ม้วนได้ด้วย 70% และ 95% เอธานอล แล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- นำดีเอ็นเอที่ผึ่งแห้งแล้วมาละลายใน 0.1 SSC ปริมาตร 3-5 มล. แล้วเก็บรักษาไว้ได้ในตู้เย็น
- นำสารละลายดีเอ็นเอ มาทรีตด้วย RNase A + RNase T_1 ปริมาตร 0.3 มล. บ่มไว้ที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 30-60 นาที แล้วเติม 10 SSC ปริมาตร 0.5 มล. หลังจากนั้นเติมฟีนอล-คลอโรฟอร์ม 5 มล. ให้เข้ากัน แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที
- นำสารละลายดีเอ็นเอส่วนบนมาตกตะกอนด้วยเอธานอลที่เย็น แล้วม้วนด้วยแท่งแก้ว ล้างด้วยเอธานอล 70 และ 95% ตามลำดับ แล้วผึ่งให้แห้ง
- จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ผึ่งแห้งแล้วมาละลายใน 0.1 SSC ปริมาตร 3-5 มล. ขึ้นกับปริมาณดีเอ็นเอที่เหลือ ในหลอดทดลอง หรือในหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย RNase A + RNase T_1 อีกประมาณ 2-3 ครั้ง
- นำดีเอ็นเอ มาทรีตด้วยเอนไซม์โปรตีเนส เค ปริมาตร 0.3 มล. แล้วนำไปไว้ที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 30-60 นาที เติม 10 SSC ปริมาตร 0.5 มล. หลังจากนั้นเติมฟีนอล-คลอโรฟอร์ม 5 มล. เขย่าผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
- นำส่วนบนมาตกตะกอนด้วยเอธานอลที่เย็น แล้วม้วนด้วยแท่งแก้ว ล้างด้วยเอธานอล 70 และ 95% ตามลำดับ แล้วผึ่งให้แห้ง
- จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ผึ่งแห้งแล้วมาละลายใน 0.1 SSC ปริมาตร 0.3-0.5 มล. แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปวัดความเข้มข้นค่าดูดกลืนแสง 260 และ 280 นม. ซึ่งสามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ 260 ต่อที่ 280 นม.

<u>การทำ DNA-DNA hybridization</u>

- ทำการตรึง ดีเอ็นเอ สายเดี่ยวลงใน Microplate wells (การทำ immobilization DNA)
  - ใช้สารละลายดีเอ็นเอ 100 ไมโครลิตร บรรจุลงใน Eppendoft (0.1 มก. / มล. สารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง และสายพันธุ์มาตรฐาน) ต้มให้เดือดนาน 10 นาที เพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ เป็นสายเดี่ยว และทำให้เย็นทันทีในน้ำแข็ง
  - เติม 2 PBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร น้ำกลั่น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วปั่นผสมด้วยเวอเท็กซ์ (Vortex)

- นำสารละลายดีเอ็นเอ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยอดลงใน Microplate wells แล้วบ่มที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 2 ชม.
- เทสารละลายดีเอ็นเอจาก Microplate และล้างด้วย PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- ทำ Microplate แห้งที่ 60 °ซ. นาน 2 ชม. และเก็บไว้ในเดสซิเคเตอร์ (Desicator)

<u>การติดฉลากดีเอ็นเอสายพันธุ์มาตรฐาน (Labeled probe DNA) ด้วยโฟโตไบโอติน (Photobiotin)</u>

- นำสารละลายดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตรใส่ลงใน Eppendoft (1 มก. / มล. สารละลายดีเอ็นเอ) เติมสารละลายโฟโตไบโอติน 15 ไมโครลิตร (1 มก. / มล. สารละลายโฟโตไบโอติน)
- ติดฉลากภายใต้แสง (Sunlamp : 500 วัตต์) เป็นเวลา 25 นาที เติม ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลลาร์ pH 7.6 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมบิวธานอล (n-butanol) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วผสมโดยใช้เวอเท็กซ์ (Vortex)
- เซนตริฟิวจ์ด้วยอัตราเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วินาที
- ดูดบิวธานอลส่วนบนออก ควรเติมบิวธานอลอีกครั้งแล้วนำไปเซนตริฟิวจ์และดูดออก เพื่อขจัดโฟโตไบโอติน แล้วนำดีเอ็นเอที่ติดฉลากนี้ไปต้มเป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในน้ำแข็ง และนำไปโซนิเคต เป็นเวลา 3 นาที
- เตรียมละลายสาร Biotinylated DNA (สายดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไบโอตินแล้ว) ใน 10 มิลลิลิตรของสารละลายไฮบริไดซ์ (Hybridization solution) แล้วนำไปหยดลงใน Microplate wells ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 49 °ซ. เป็นเวลา 12 ชม.
[คำนวณอุณหภูมิที่เหมาะสมจากสูตร : Hybridization temperature (°ซ.) = (0.41 x % GC-content) + 24.3]

<u>ขั้นตอนการตรวจสอบ Hybridized DNA ด้วยสเตร็ปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส (Streptavidin-peroxidase)</u>

- ทิ้งสารละลายไฮบริไดซ์ที่อยู่ใน Microplate wells
- ล้างแต่ละหลุมด้วย 0.2 SSC ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายที่ 1 (Solution 1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- ทิ้งสารละลายที่ 1 ที่อยู่ใน microplate wells แล้วเติมสารละลายที่ 2 ลงไป แล้วบ่มที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที

- ทิ้งสารละลายที่ 2 ที่อยู่ใน microplate wells แล้วล้างแต่ละหลุมด้วย PSB ปริมาตร200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายที่ 3 ลงไปในแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มที่ 20-37 °ซ. เป็นเวลา 10 นาที จะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า จึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 620 นม. ด้วยเครื่อง Microplate reader
- หยุดปฏิกิริยาโดยทำการหยอดกรดซัลฟูริคที่ความเข้มข้น 2 โมลลาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นม. ด้วยเครื่อง microplate reader แล้วนำค่าที่ความยาวคลื่นนี้ไปคำนวณ % DNA homology ดังสูตร

$$\% \text{ DNA homology} = \frac{(\text{ค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ ตัวอย่าง} - \text{ค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเออ้างอิง})}{(\text{ค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ probe} - \text{ค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเออ้างอิง})}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับเอธานอลในอาหารเหลว Y (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.1) ของเชื้อรหัส SF 18-1 ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
เอธานอล	4	0.5478	975.3661*
Error	5	0.0006	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ ข.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับเอธานอลในอาหารเหลว Y (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.1) ของเชื้อรหัส GR 24-2 ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
เอธานอล	4	0.7199	724.5012*
Error	5	0.0010	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ ข.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับเอธานอลในอาหารเหลว Y (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.1) ของเชื้อรหัส OR 56-1 ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
เอธานอล	4	0.6442	621.2943*
Error	5	0.0010	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ ข.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับเอธานอลในอาหารเหลว Y (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.1) ของเชื้อรหัส BS 58-2 ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
เอธานอล	4	0.4771	233.3027*
Error	5	0.0020	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ ข.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับเอธานอลใน อาหารเหลว Y (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.1) ของเชื้อรหัส MG 69-2 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
เอธานอล	4	0.5237	323.2489*
Error	5	0.0016	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับเอธานอลใน อาหารเหลว Y (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.1) ของเชื้อรหัส TISTR 354^{T} ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
เอธานอล	4	0.4357	1,080.6463*
Error	5	0.0004	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดอะซิติก ในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ของเชื้อรหัส SF 18-1 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
กรดอะซิติก	4	0.2768	145.0542*
Error	5	0.0019	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดอะซิติก ในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ของเชื้อรหัส GR 24-2 ที่ 30 °ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
กรดอะซิติก	4	0.6467	123.7252*
Error	5	0.0052	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดอะซิติก ในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ของเชื้อรหัส OR 56-1 ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
กรดอะซิติก	4	0.1997	12.5348*
Error	5	0.0159	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดอะซิติก ในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ของเชื้อรหัส BS 58-2 ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
กรดอะซิติก	4	0.8035	125.9607*
Error	5	0.0064	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดอะซิติก ในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ของเชื้อรหัส MG 69-2 ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
กรดอะซิติก	4	0.8034	132.4260*
Error	5	0.0061	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับกรดอะซิติก ในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ของเชื้อรหัส TISTR 354 ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
กรดอะซิติก	4	0.3278	167.3534*
Error	5	0.0020	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับ กรดคาซามิโน ในอาหารเหลว EAY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.2) ของเชื้อรหัส SF 18-1 ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
กรดคาซามิโน	4	0.5746	353.4279*
Error	10	0.0016	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับ กรดคาซามิโน ในอาหารเหลว EAY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.2) ของเชื้อรหัส GR 24-2 ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
กรดคาซามิโน	4	0.4046	196.4126*
Error	10	0.0021	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับ กรดคาซามิโน ในอาหารเหลว EAY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.2) ของเชื้อรหัส OR 56-1 ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
กรดคาซามิโน	4	0.4159	63.5407*
Error	5	0.0065	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับ กรดคาซามิโน ในอาหารเหลว EAY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.2) ของเชื้อรหัส BS 58-2 ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
กรดคาซามิโน	4	0.4906	134.9827*
Error	5	0.0036	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับ กรดคาซามิโน ในอาหารเหลว EAY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.2) ของเชื้อรหัส MG 69-2 ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
กรดคาซามิโน	4	0.7785	83.3455*
Error	5	0.0093	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ ข.18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับ กรดคาซามิโน ในอาหารเหลว EAY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.2) ของเชื้อรหัส TISTR 354^{T} ที่ 30 ^{0}ซ. ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
กรดคาซามิโน	4	0.3043	24.1929*
Error	5	0.0126	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ ข.19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส SF 18-1 ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
อุณหภูมิ	2	4.6170	2,583.9897*
Error	6	0.0018	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ ข.20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส GR 24-2 ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
อุณหภูมิ	2	6.8520	2,574.125*
Error	6	0.0027	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ ข.21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส OR 56-1 ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
อุณหภูมิ	2	0.3933	62.4303*
Error	3	0.0063	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ ข.22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส BS 58-2 ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
อุณหภูมิ	2	1.8883	1,340.4936*
Error	3	0.0014	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ ข.23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส MG 69-2 ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
อุณหภูมิ	2	4.8997	173.1558*
Error	3	0.0283	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ ข.24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส TISTR 354^T ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
อุณหภูมิ	2	2.7236	200.5006*
Error	3	0.0136	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ ข.25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรด (กรัม/100 มล.) ต่อการแปรระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักในอาหารเหลว EACY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5.3) ของเชื้อรหัส TISTR 1056^{T} ในวันที่ 3 ของการหมัก

SOV	df	MS	F
อุณหภูมิ	2	2.2600	142.7445*
Error	3	0.0158	-----

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความหนาของชั้นเซลลูโลส (มม.) ในวันที่ 3, 6 ,9 , 12 และ 14 ของการหมักในอาหารเหลวสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.7) ของเชื้อรหัส BB 150-1, MW 151-1, JF 152-1, BS 153-1, AP 154-1, LD 155-1 และ TISTR 893

SOV	df	MS					F				
		วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 14	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 14
เซลลูโลสจากแต่ละเชื้อ	6	0.0294	0.2169	0.138	0.3848	1.3178	0.4839^{ns}	1.7321^{ns}	0.4638^{ns}	5.2437*	7.9850*
Error	14	0.0607	0.1252	0.2975	0.0734	0.1650	-----	-----	-----	-----	-----

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P≤0.05)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ตารางที่ ข.27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักเปียก น้ำหนักแห้ง (กรัม) และ แรงสูงสุดที่เจาะทะลุผ่าน (N.) ของชั้นเซลลูโลส ภายหลังจากการหมัก 14 วันในอาหารเหลวสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.7) ของเชื้อรหัส BB 150-1, MW 151-1, JF 152-1, BS 153-1, AP 154-1, LD 155-1 และ TISTR 893

SOV	df	MS			F		
		น้ำหนักเปียก	น้ำหนักแห้ง	แรงสูงสุด	น้ำหนักเปียก	น้ำหนักแห้ง	แรงสูงสุด
เซลลูโลสจากแต่ละเชื้อ	6	687.5157	2.0554	16.0991	10.6358*	8.5404*	0.7597^{ns}
Error	14	64.6599	0.2407	21.1926	-----	-----	-----

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P≤0.05)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)