บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การแยกเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ

การแยกเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียจะใช้การทดสอบการย้อมแกรม และการสร้างเอนไซม์แคตาเลสเป็นสำคัญโดยการทดสอบทั้งสองนี้จะช่วยแยกความแตกต่างระหว่างอะซิติกแอซิดแบคทีเรียและแลคติกแอซิดแบคทีเรียออกจากกันได้ นอกจากนี้อะซิติกแอซิดแบคทีเรียยังสามารถผลิตกรดอะซิติกจากเอธานอลได้ (Yamada และคณะ, 1997) ในการแยกเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียนั้น นอกจากการย้อมแกรมและการทดสอบแคตาเลสจะมีความสำคัญที่จะบ่งบอกว่าเชื้อที่แยกได้เป็นอะซิติกแอซิดแบคทีเรียแล้ว การทดสอบการออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตทก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยในช่วงก่อนปี ค.ศ. 1964 นั้น อะซิติกแอซิดแบคทีเรียได้ถูกแบ่งเป็น 2 สกุล คือ *Gluconobacter* และ *Acetobacter* โดยพิจารณาตามความสามารถในการออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท ซึ่งเชื้อสกุล *Acetobacter* นั้นมีความสามารถในการออกซิไดส์แลคเตทและอะซิเตท คือสามารถเปลี่ยนสีโบรโมไทมอลบลู (Bromothymol blue) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมอะซิเตทจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินได้ ส่วนสกุล *Gluconobacter* นั้นไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเตท (Asai และคณะ, 1964 ; Asai, 1968) ดังนั้นจากงานวิจัยในขั้นตอนการแยกเชื้อนี้จึงได้มีการทดสอบความสามารถในการออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท มีเชื้อที่แยกได้ถึง 144 สายพันธุ์ที่สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท ซึ่งเชื้อทั้งหมดมีความใกล้เคียงกับเชื้อในสกุล *Acetobacter* มากกว่า *Gluconobacter* ส่วนอีก 4 สายพันธุ์ไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท ซึ่งน่าจะมีความใกล้เคียงกับสกุล *Gluconobacter* มากกว่า และการทดสอบนี้ทำให้ทราบเบื้องต้นว่าเชื้อที่แยกได้นั้นมีลักษณะที่แตกต่างกันและเพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกเชื้อตัวแทนไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป จากผลการแยกเชื้อจากผลไม้ 34 ชนิด ได้เชื้อทั้งหมด 148 สายพันธุ์ และคัดเลือกไว้ 74 สายพันธุ์เพื่อศึกษาต่อไป

ส่วนการวัดค่า TSS จากผลไม้ทั้งหมด 34 ชนิดนั้น มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4.1-33.5 °B. นั่นก็คือไม่ว่าผลไม้จะมีค่า TSS สูงหรือต่ำก็มีโอกาสพบอะซิติกแอซิดแบคทีเรียได้เท่ากัน (ตารางที่ 4.1) แต่สำหรับเชื้อ *Gluconobacter* sp. (กลุ่มที่ 4) นั้นไม่ค่อยพบเนื่องจากเจริญได้ช้ากว่าเชื้อในกลุ่มอื่นๆ และเจริญได้ไม่ค่อยดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอธานอลเป็นองค์ประกอบ (Yamada และคณะ, 1997) ซึ่งในอาหารเหลว GEY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.1) ประกอบด้วย กลูโคส 2.0 % เอธานอล 5.0 % ผงยีสต์สกัด 0.5 % ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า การที่แยกเชื้อ *Gluconobacter* sp. (เชื้อกลุ่มที่ 4) ได้เพียง 4 สายพันธุ์นั้นเพราะผลจากการเติมเอธานอลนั่นเอง เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Yamada และคณะ (1976 b) ได้แยก เชื้ออะซิติกแอซิดแอซิดแบคทีเรียจากผลราสเบอรี่ (Raspberry) โดยใช้อาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 1.0 % เอธานอล 0.5 % ผงยีสต์สกัด 0.5 % เปปโตน 0.3 % และกรดอะซิติก 0.03% พบว่าเชื้อที่แยกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ไม่ใช่เชื้อสกุล *Gluconobacter* ซึ่งอธิบายได้ว่าการที่ไม่สามารถแยกเชื้อสกุล *Gluconobacter* ได้เพราะว่า

เอธานอลในอาหารแยกเชื้อนั้นมีผลทำให้การเจริญของเชื้อช้าลง หรืออาจเป็นไปได้ว่ามีเชื้อสกุล *Gluconobacter* เริ่มต้นมีน้อยกว่ากลุ่มอื่นจึงทำให้แยกไม่ได้ ดังนั้นถ้าต้องการแยกเชื้อ *Gluconobacter* sp. ให้ได้มากขึ้นควรใช้อาหารแยกเชื้อที่ไม่มีเอธานอลเป็นองค์ประกอบ

5.2 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ

จากการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา ทางชีวเคมีของเชื้อแล้วทำให้สามารถจัดกลุ่มของเชื้อทั้งหมด 74 สายพันธุ์ที่เลือกไว้ ซึ่งมีลักษณะเหมือนกันหลายประการ คือเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเซลล์เป็น Short rod เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา สร้างกรดอะซิติกจากเอธานอลได้ สร้างเอนไซม์แคตาเลส รวมทั้งยังสามารถผลิตกรดกลูโคนิคและกรด 2-คีโตกลูโคนิค แต่ไม่สร้างรงควัตถุสีน้ำตาล และจากลักษณะที่สำคัญแตกต่างทำให้สามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้ (ตารางที่ 4.3-4.4)

เชื้อกลุ่มที่ 1 มี 45 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบรอบเซลล์ (Peritrichous flagella) และลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ มีลักษณะกลมสีครีมเข้ม สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท เชื้อกลุ่มนี้ไม่สร้างเมือกหรือเซลลูโลสขณะเจริญ แต่เชื้อกลุ่มนี้ให้ผลบวกกับการทดสอบ VP หรือสามารถสร้างอะซิติลเมทธิลคาร์บินอลได้ และไม่สามารถผลิตกรด 5-คีโตกลูโคนิก ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Acetobacter pasteurianus* (Asai และคณะ,. 1964 ; De Ley และ Fratuer, 1974 ; De Ley และคณะ, 1984 ; Urakami และคณะ, 1989 ; Holt, 1994 Yamada และคณะ, 1997) นอกจากนี้ยังมีลักษณะเหมือนกับเชื้อมาตรฐาน *Acetobacter pasteurianus* TISTR 1056^T (ตารางที่ 4.4) จึงจัดเชื้อทุกสายพันธุ์ของกลุ่มนี้เป็น *A. pasteurianus*

เชื้อกลุ่มที่ 2 มี 13 สายพันธุ์ ซึ่งจะมีข้อแตกต่างจากเชื้อกลุ่มที่ 1 คือเชื้อกลุ่มนี้ให้ผลลบกับการทดสอบ VP หรือไม่สามารถสร้างอะซิติลเมทธิลคาร์บินอล แต่สามารถผลิตกรด 5-คีโตกลูโคนิกได้ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Acetobacter aceti* (Asai และคณะ, 1964 ; De Ley และ Fratuer, 1974 ; Urakami และคณะ, 1989 ; Holt, 1994) นอกจากนี้ยังมีลักษณะเหมือนกับเชื้อมาตรฐาน *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^T และ *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* TISTR 753^T (ตารางที่ 4.4) แต่เชื้อกลุ่มที่ 2 นี้ไม่สามารถเจริญบนอาหารวุ้นไฮเยอร์-เฟรเทอร์ (Hoyer-Frateur agar) ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับเชื้อมาตรฐาน *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* TISTR 753^T จึงจัดเชื้อทุกสายพันธุ์ของกลุ่มนี้เป็น *Acetobacter aceti*

เชื้อกลุ่มที่ 3 มี 12 สายพันธุ์ โดยเชื้อกลุ่มนี้จะมีลักษณะแตกต่างจากเชื้อกลุ่มที่ 1 และ 2 อย่างชัดเจนก็ คือมีลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ เป็นลักษณะกลมสีครีมและมีเมือกของเซลลูโลสรอบโคโลนี ส่วนการเจริญในอาหารเหลวนั้นจะมีการสร้างชั้นเซลลูโลสอยู่บนผิวหน้าของอาหาร (Colvin และคณะ, 1977 ; Toyosaki และคณะ, 1995 ; De Ley และ Fratuer, 1974 ; Yamada, 1983 ; Holt, 1994 ; Urakami และคณะ, 1989 ; Yamada และคณะ, 1997) และยังมีลักษณะสำคัญที่เหมือนกับ

Gluconoacetobacter xylinus TISTR 893 (ตารางที่ 4.4) จึงจัดเชื้อทุกสายพันธุ์ของกลุ่มนี้เป็น *Gluconoacetobacter xylinus*

เชื้อกลุ่มที่ 4 มี 4 สายพันธุ์ ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้มีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบขั้วเซลล์ (Polar flagella) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Gluconobacter* (Holt, 1994 ; Yamada และคณะ, 1997) ส่วนลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ มีสีครีมเป็นมัน เชื้อกลุ่มนี้ไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท แต่สามารถเจริญในอาหารที่มีแมนนิทอลเป็นองค์ประกอบได้และนอกจากนี้ยังสามารถผลิตกรดได้จากซอร์บิทอลและแมนนิทอลซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อกลุ่มนี้ (Asai และคณะ, 1964 ; Asai, 1968 ; De Ley และ Fratuer, 1974 ; De Ley และคณะ, 1984 ; Holt, 1994 ; Yamada และคณะ, 1997) นอกจากนี้ยังมีลักษณะที่สำคัญเหมือนกับเชื้อมาตรฐาน *Gluconobacter cerinus* TISTR 756^T (ตารางที่ 4.4) จึงจัดเชื้อทุกสายพันธุ์ของกลุ่มนี้เป็น *Gluconobacter* sp.

5.3 <u>การศึกษาระบบยูบิควิโนน</u>

จากผลการศึกษาระบบยูบิควิโนนในตารางที่ 4.5 ทำให้ช่วยยืนยันการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มชัดเจนยิ่งขึ้น คือเชื้อกลุ่มที่ 1 มีจำนวน 45 สายพันธุ์ ดังนี้ 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 และ WM 86-1 เชื้อตัวแทนของกลุ่มมียูบิควิโนนชนิด 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) สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปในมะขามเปรี้ยว ละมุด ขนุน มะม่วง องุ่นแดง ลำไย กล้วยหอม กล้วยน้ำว้า กล้วยไข่ พุทรา น้อยหน่า สตรอเบอรี่ สับปะรด เงาะ ลองกอง ลางสาด มะละกอ ท้อ แตงโม ส้มเขียวหวาน มะยม ชมพู่ มะขามเทศ มะกรูด เสาวรส ฝรั่ง และแอปเปิ้ล

เชื้อกลุ่มที่ 2 จำนวน 13 สายพันธุ์ ดังนี้ 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 124-2, SF 17-1, SF 18-1 และ TP 126-2 เชื้อตัวแทนกลุ่มนี้มียูบิควิโนนชนิด Q-9 ให้ผลลบกับการทดสอบ VP แต่สามารถผลิตกรด 5-คีโตกลูโคนิคได้ จึงจัดเป็นสายพันธุ์ *A. aceti* (Asai และคณะ, 1964 ; De Ley และ Fratuer, 1974 ; Urakami และคณะ, 1989 ; Holt, 1994 ; Yamada และคณะ, 1997) สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปในองุ่นเขียว มังคุด น้อยไหน่ง มะเฟือง แคนตาลูป แตงไทย มะขามเทศ มะกรูด และเสาวรส

เชื้อกลุ่มที่ 3 จำนวน 12 สายพันธุ์ ดังนี้ 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 เชื้อตัวแทนกลุ่มนี้มียูบิควิโนนชนิด Q-10 และสามารถผลิตเซลลูโลสได้จึงจัดเป็นสายพันธุ์ *Gluconoacetobacter xylinus* (De Ley และ Fratuer, 1974 ; Yamada, 1983 ; Holt, 1994 ; Urakami และคณะ, 1989 ; Yamada และคณะ, 1997) สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปในขนุน กล้วยหอม กล้วยไข่ ลองกอง แอปเปิ้ล และแตงโม

เชื้อกลุ่มที่ 4 จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ PG 123-1, PG 123-2, PY 125-2 และ TP 126-1 เชื้อตัวแทนกลุ่มนี้มียูบิควิโนนชนิด Q-10 มีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบขั้วเซลล์ ลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ มีสีครีมเป็นมัน เชื้อกลุ่มนี้ไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท แต่สามารถผลิตกรดจากซอร์บิทอลและแมนนิทอลได้ จึงจัดเป็นสายพันธุ์ *Gluconobacter cerinus* (Asai และคณะ, 1964 ; Asai, 1968 ; De Ley และ Fratuer, 1974 ; De Ley และคณะ, 1984 ; Holt, 1994 ; Yamada และคณะ, 1997) สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปในมะละกอ ทับทิม และมะขามเทศ

5.4 <u>การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดอะซิติกหรือเซลลูโลสปริมาณสูง</u>

5.4.1 การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดอะซิติกได้ปริมาณสูง

สำหรับสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดอะซิติกปริมาณสูงนั้นได้คัดเลือกไว้ 5 สายพันธุ์ คือ *Acetobacter pasteurianus* GR 24-2, OR 56-1, BS 58-2 และ MG 69-2 รวมทั้ง *A. aceti* SF 18-1 (ตารางที่ 4.6) ซึ่งสามารถผลิตกรดได้สูงสุด 5 อันดับแรกและยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นอกจากสายพันธุ์ OR 56-1 ที่สามารถเจริญได้ที่ 40 °ซ. เชื้อเหล่านี้มีความน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาปัจจัยเบื้องต้นที่มีผลต่อการผลิตกรด เนื่องจากอะซิติกแอซิดแบคทีเรียที่มีลักษณะเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดนั้น นอกจากจะผลิตกรดได้ในปริมาณสูงแล้วควรเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงด้วย เพราะเชื้อที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูในปัจจุบันเหมาะสมกับการหมักที่ 30 °ซ. เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น 1-2 °ซ. จะทำให้การหมักช้าลงหรือหยุดชะงัก ดังนั้นในโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชูหรือกรดอะซิติกจึงต้องมีระบบหล่อเย็น (Cooling system) ซึ่งจะเสียค่าใช้จ่ายในระบบนี้สูงมาก (นภา ไล่ห์ทอง, 2520 ; Theeragool และคณะ, 1997)

5.4.2 การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูง

เชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูงที่คัดเลือกไว้ 6 สายพันธุ์ได้แก่ *Gluconoacetobacter xylinus* 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

5.5 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

5.5.1 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% ทำให้เชื้อทุกสายพันธุ์ผลิตกรดได้สูงกว่าความเข้มข้นอื่นหลังจากการหมัก 3 วัน เนื่องจากเอธานอลเป็นซับสเตรทที่จะเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกโดยอาศัยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และอะเซตัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสจากเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย (Allgeier และ Hildebrandt, 1960) และพบว่าเชื้อตัวแทนทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันในช่วง 1.479-1.659 กรัม/100 มล. แต่เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *A. aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^T ผลิตกรดได้ต่ำกว่า คือ 1.166 กรัม/100 มล. มีงานวิจัยของ Ohmori และคณะ (1980) ได้ใช้เชื้อสายพันธุ์ *A. aceti* subsp. *aceti* S-13 ที่แยกได้จากผลไม้ไน่ประเทศญี่ปุ่น มาศึกษาการผลิตกรดในอาหารเหลวซึ่งประกอบด้วย ผงยีสต์สกัด 0.5%โพลีเปปโตน (Polypeptone) 0.2% กลูโคส 3.0% กรดอะซิติก 1.0% และเอธานอล 4.0% โดยเลี้ยงเชื้อในภาวะเขย่าแบบกลับไปกลับมา (Reciprocating shake) ที่อัตรา 120 รอบต่อนาทีพบว่าที่เวลาการหมัก 3 วัน เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตกรดได้ถึง 4.0 กรัม/100 มล. การที่เชื้อในงานวิจัยของ Ohmori และคณะ สามารถผลิตกรดได้สูงกว่างานวิจัยในขั้นตอนนี้อาจเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน กล่าวคือในงานวิจัยนี้ใช้อาหารที่ประกอบด้วย ผงยีสต์สกัด และเอธานอล แต่ในงานวิจัยของ Ohmori และคณะยังใช้องค์ประกอบอื่น ได้แก่โพลีเปปโตน 0.2% กลูโคส 3.0% และกรดอะซิติก 1.0% นอกจากนี้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ จากงานวิจัยของ Ohmori และคณะ คือ 6.25% v/v ในขณะที่งานวิจัยนี้ใช้เชื้อเริ่มต้นเพียง 1.0% v/v อีกสาเหตุหนึ่ง คือ จากการเลี้ยงเชื้อของ Ohmori และคณะ ได้ใช้การเขย่าแบบกลับไปกลับมาและใช้ฟลาสก์ขนาด 500 มล. ซึ่งการเลี้ยงเชื้อแบบนี้จะเป็นการให้อากาศที่สูงกว่าภาวะการเลี้ยงที่งานวิจัยนี้ ซึ่งทำการหมักในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ในปริมาณอาหารเหลวที่เท่ากัน คือ 80 มล. และเลี้ยงเชื้อในภาวะเขย่า (Rotary shake) ซึ่งจะมีอัตราการให้อากาศที่ต่ำกว่าทำให้มีการเจริญของอะซิติกแอซิดแบคทีเรียต่ำกว่า เนื่องจากเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญนั่นเอง (De Ley และ Fratuer, 1974) จากสาเหตุที่กล่าวมาทั้งหมดจึงส่งผลให้การผลิตกรดอะซิติกของเชื้อทุกสายพันธุ์ในขั้นตอนของงานวิจัยนี้ต่ำกว่าการผลิตกรดในงานวิจัยของ Ohmori และคณะ

5.5.2 ศึกษาปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่เหมาะสม

ในขั้นตอนนี้อาหารเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วย 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% การที่เติมกรดอะซิติกลงไปแล้วทำให้การผลิตกรดสูงขึ้นนี้สามารถอธิบายได้ว่า ทั้งเอธานอลและกรดอะซิติกที่เติมในปริมาณที่เหมาะสมนี้จะเป็นปัจจัยเสริมกันทำให้เชื้อเจริญได้ดีและผลิตกรดได้เร็วขึ้น โดยไปช่วยลดระยะ Lag phase ของเชื้อ (Nanba และคณะ, 1984) จากขั้นตอนของงานวิจัยนี้ ปริมาณเอธานอลที่ 4.0% และกรดอะซิติกที่ 0.5 หรือ 1.0% จะเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะซิติก นอกจากนี้ Adam (1985) ยังได้เสนอว่าในการผลิตน้ำส้มสายชูทั่วๆไปนั้นไม่สามารถทำให้เกิดภาวะปลอดเชื้อได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องเติมกรดอะซิติกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเบื้องต้นเพื่อยับยั้งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามการเติมกรดอะซิติกลงไปก็มีข้อจำกัด เนื่องจากอะซิติกแบคทีเรียโดยทั่วไปจะเจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดเป็นด่างในช่วง 5.4-6.3 ซึ่งถ้าเติมกรดอะซิติกเริ่มต้นมากเกินไปก็จะไปมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดของเชื้อ (De Ley และคณะ, 1984) จากการวิจัยพบว่าเชื้อที่แยกได้ทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน 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% ในขณะที่เชื้อ *A. aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^{T} สามารถผลิตกรดได้ 1.833 กรัม/100มล. ที่ระดับการเติมกรดอะซิติก 1.0%

5.5.3 ศึกษาปริมาณกรดคาซามิโนเริ่มต้นที่เหมาะสม

ในการวิจัยในขั้นนี้อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยผงยีสต์สกัด 0.5% เอธานอล 4.0% กรดอะซิติก 0.5% สำหรับสายพันธุ์ SF 18-1 และ GR 24-2 และกรดอะซิติกที่ระดับ 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. ซึ่งเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดได้สูงเมื่อเติมกรดคาซามิโน 0.5% การที่เชื้อสามารถผลิตกรดอะซิติกสูงมากขึ้นนั้นอธิบายได้ว่า กรดคาซามิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้เร็วยิ่งขึ้นและส่งผลให้มีกิจกรรมในเซลล์รวมทั้งความสามารถในการผลิตกรดเป็นไปได้มากและรวดเร็วขึ้นนั่นเอง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mori และ Harada (1973) ซึ่ง

ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อ "*Acetobacter rancens*" S3 และ F11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ได้แก่ เอธานอล 2.0% และแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน ดังนี้ทรีทเมนต์แรก ประกอบด้วยกรดคาซามิโน 0.5% ทรีทเมนต์ที่ 2 ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ 0.5% และทรีทเมนต์ที่ 3 ประกอบด้วยไพลีเปปโตนและผงยีสต์สกัดอย่างละ 0.5% ภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 3 วัน ในภาวะเขย่า ที่ 30 °ซ. แล้วทำการวัดการเจริญของเซลล์เชื้อในด้านความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ S3 และ F11 สามารถเจริญเติบโตได้มากที่สุด เมื่อเติมเอธานอล 2.0% และกรดคาซามิโน 0.5% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำให้มีค่า $O.D._{600}$ เป็น 0.66 และ 0.75 ตามลำดับ

5.5.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมัก

ภายหลังการศึกษาเบื้องต้นถึงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของแต่ละสายพันธุ์แล้ว จึงได้นำเชื้อทุกสายพันธุ์ไปศึกษาแปรอุณหภูมิในการหมักที่ 30, 37 และ 40 °ซ. ซึ่งในขั้นตอนนี้ได้มีการเพิ่มเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานอีกสายพันธุ์หนึ่ง คือ *Acetobacter pasteurianus* TISTR 1056^T ในการหมักเปรียบเทียบด้วย เนื่องจากว่าสายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดได้ที่อุณหภูมิสูง (เผด็จ วัชรโกมลพันธ์, 2540) จากผลการวิจัยในวันที่ 3 ของการหมักพบว่า การหมักที่ 37 °ซ. เชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ทุกสายพันธุ์ 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. แต่สำหรับสายพันธุ์มาตรฐาน *A. aceti* subsp. *aceti* TISTR 354^T และ *A. pasteurianus* TISTR 1056^T สามารถผลิตได้เพียง 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. ดังนั้นจึงเป็นเชื้อที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมเพราะสามารถผลิตกรดและทนอุณหภูมิได้สูง ซึ่งทำให้การหมักดำเนินต่อไปได้แม้อุณหภูมิจะสูงขึ้นบ้างซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในส่วนระบบหล่อเย็นลงได้ (นภา โล่ห์ทอง, 2520) จากงานวิจัยของ Ohmori และคณะ (1980) ได้ใช้เชื้อ *A. aceti* subsp. *aceti* S-13 ที่แยกได้จากผลไม้ในประเทศญี่ปุ่น มาศึกษาการผลิตกรดในอาหารเหลว โดยเลี้ยงเชื้อในภาวะเขย่าแบบกลับไปกลับมา ที่อัตรา 120 รอบต่อนาทีพบว่าที่เวลาการหมัก 3 วัน เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถผลิตกรดอะซิติกได้เลยทั้งที่อุณหภูมิในการหมัก 37 และ40°ซ.

และยังพบว่าสายพันธุ์ *Acetobacter pasteurianus* GR 24-2, OR 56-1, BS 58-2 และ MG 69-2 รวมทั้งสายพันธุ์ *A. aceti* SF 18-1 สามารถผลิตกรดได้สูงในอาหารที่เติมเอธานอล 4.0% กรดอะซิติก 0.5-1.0% กรดคาซามิโน 0.5% ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีผงยีสต์สกัดเริ่มต้น 0.5% เมื่อใช้อุณหภูมิการหมัก 30-37 °ซ. แต่สำหรับสายพันธุ์ *A. pasteurianus* OR 56-1 สามารถผลิตกรดแม้ที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 40 °ซ. ได้ถึง 1.875 กรัม/100 มล. ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับงานวิจัยของ Saeki และคณะ (1997) ได้ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดที่อุณหภูมิ 40 °ซ. ของเชื้อ "*Acetobacter lovaniensis*" SKU 1108 และ SKU 1104 ซึ่งแยกได้

จากผลไม้ทำการหมักในถังหมัก (Jar fermentor) ในอาหารที่แหล่งคาร์บอนเริ่มต้นได้แก่ เอธานอล 4.0% และกรดอะซิติก 1.0% พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดได้ 2.2-2.4 กรัม/100 มล. ในวันที่ 3 ของการหมักตามลำดับ ซึ่งการที่เชื้อ SKU 1108 และ SKU 1104 สามารถผลิตกรดได้สูงกว่าเชื้อ OR 56-1 เพราะว่าในการศึกษาของ Saeki และคณะ (1997) ได้ใช้ถังหมักแต่สำหรับงานวิจัยในขั้นตอนนี้ใช้เพียงภาวะเขย่าแบบหมุนเท่านั้น ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตกรดอะซิติกต่ำกว่ากว่าการใช้ถังหมัก (นภา ไล่ห์ทอง, 2520) นอกจากเหตุผลดังกล่าวแล้วเชื้อที่ใช้ในการศึกษาก็เป็นคนละสายพันธุ์ด้วย

5.6 <u>การศึกษาปริมาณการผลิตเซลลูโลส</u>

การศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ได้แก่ *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 ($P\leq0.05$) แต่เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 14 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้เกือบทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงกว่าเชื้อ *Gluconoacetobacter xylinus* TISTR 893 สำหรับค่าแรงเจาะทะลุผ่านโดยใช้เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของเซลลูโลสที่ผลิตได้จากแต่ละสายพันธุ์นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P\leq0.05$) เชื้อทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเซลลูโลสได้ในวันที่ 14 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการหมักได้ น้ำหนักเปียกในช่วง 165.41-209.71 กรัม และน้ำหนักแห้ง 9.10-11.53 กรัม โดยเชื้อสายพันธุ์ BB 150-1, WM 151-1, JF 152-1 และ AP 154-1 สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงกว่าเชื้อ *Gluconoacetobacter xylinus* TISTR 893 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$) ส่วนเชื้อสายพันธุ์ BS 153-1 และ LD 155-1 ผลิตเซลลูโลสได้ไม่แตกต่างจากเชื้อ *Gluconoacetobacter xylinus* TISTR 893 ($P\leq0.05$)

ในประเทศไทยการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เพื่อการบริโภค โดยมีชื่อเรียกทางการค้าว่า Nata De Coco แต่ในต่างประเทศหันมาใช้ประโยชน์เพื่ออุตสาหกรรมการผลิตเซลลูโลสกันมากขึ้นได้มีงานวิจัยของ Toyosaki และคณะ (1995) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเซลลูโลส ดังนั้นจึงต้องการเชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงและรวดเร็ว โดยได้ใช้เชื้อ *Acetobacter* sp. BPR 2001 ซึ่งแยกได้จากผลไม้และทดลองเลี้ยงเชื้อนี้ในภาวะนิ่ง (Static culture) และภาวะเขย่า (Shaking culture) โดยใช้เวลาหมัก 3 วัน ที่ 28 °ซ. พบว่าเชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสได้ 15 กรัม/ตารางเมตรในภาวะนิ่งและ 0.9 กรัม/ลิตรในภาวะเขย่า จะพบว่าเชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสในภาวะเขย่าได้ปริมาณสูง ซึ่งในบ้านเราน่าจะให้ความสนใจการผลิตเส้นใยเซลลูโลสจากแหล่งนี้ให้มากขึ้น ซึ่งนอกจากจะมีความบริสุทธิ์สูงแล้วก็จะช่วยลดมลพิษในขั้นการผลิตเส้นใยเซลลูโลสจากไม้ได้ (Cannon และ Anderson, 1991)