หอสมุดกลาง 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.

แฮนด์รีแฟรคโตมิเตอร์ (Hand refractometer) รุ่น N1 ของบริษัท Atago, Japan.

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

3.1.2 <u>เคมีภัณฑ์</u> ซึ่งทั้งหมดใช้ชนิด A.R. grade

โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) ของบริษัท Merck, Germany.

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ของบริษัท Carlo, USA.

แคลเซียมแลกเตท (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.

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.

เบสิคฟุชชิน (Basic fuchsin) ของบริษัท BDH Chemical, England.

แอซิดฟุชชิน (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.

ไดแอมโมเนียมซัลเฟต (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.

แมกนีเซียมซัลเฟต (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.

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-เมเลไซโตส (D-Melezitose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.

เมลิไบโอส (Melibiose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.

แอล-ราฟฟิโนส (L-Raffinose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.

เอสคูลิน (Esculin) ของบริษัท Sigma, USA.

ดี-ไรโบส (D-Ribose) ของบริษัท Sigma, USA.

ซาลิซิน (Salicin) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

แอล-แรมโนส (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 จุลินทรีย์

เชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้เปรียบเทียบได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (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})

Gluconoacetobacter liquefaciens TISTR 1057^{T}(*A. liquefaciens* TISTR 1057^{T})

Gluconoacetobacter xylinus TISTR 893 (*A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 893)

Gluconobacter cerinus TISTR 756^{T}

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การแยกเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ

3.2.1.1 เก็บตัวอย่างผลไม้สุกงอม ได้แก่ แอปเปิ้ล กล้วยหอม กล้วยน้ำว้า กล้วยไข่ น้อยหน่า น้อยไหน่ง องุ่น ฝรั่ง ขนุน พุทรา มะกรูด ลางสาด ลองกอง ลำไย มะม่วง ส้มเขียวหวาน สับปะรด เสาวรส พีช มะละกอ ชมพู่ เงาะ มะยม ละมุด สตรอเบอรี่ มะเขือเทศ มะขามหวาน แตงโม แคนตาลูป แตงไทย มังคุด มะเฟือง มะขามเทศ และทับทิม เพราะมีปริมาณน้ำตาลค่อนข้างสูง ทำให้การหมักแอลกอฮอล์และน้ำส้มสายชูเกิดได้เองตามธรรมชาติ ตลอดจนผลไม้สุกงอมมักเป็นวัสดุเหลือทิ้งและหาได้ง่าย ทำการเก็บตัวอย่างจากตลาดสดทั่วไปในกรุงเทพมหานครและบางจังหวัดใกล้เคียง วัดปริมาณน้ำตาลของผลไม้แต่ละชนิดในรูปของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid , TSS) ด้วย แฮนด์ รีแฟรกโตมิเตอร์ (Hand refractometer) (ณัฐดา วิโรจน์แสงอรุณ และสมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 2533 ; ชินปัญญ์ ปลั่งศิริ และคณะ, 2540)

3.2.1.2 ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Enriched culture) โดยเก็บตัวอย่างผลไม้แต่ละชนิดหนักประมาณ 1-2 กรัมจากส่วนที่เป็นผลไม้ได้รอยช้ำหรือเน่าโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (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 3.2.2.3 เพื่อ 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) คัดเลือกเฉพาะเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียเพื่อนำมาศึกษาในด้านอื่นๆต่อไป

3.2.2 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรียตัวแทนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1.3 ของวิธีดำเนินงานวิจัย มาศึกษาลักษณะต่างๆ โดยในการศึกษาในข้อนี้จะทำการทดลองเพียง 1 ซ้ำ ซึ่งเป็นหลักการทั่วไปของการศึกษาลักษณะทาง

ฟีโนไทป์ของเชื้อ เว้นแต่บางการทดสอบ เช่นการย้อมสีแฟลกเจลลาของเชื้อซึ่งอาจให้ผลไม่ชัดเจนจึงจำเป็นต้องทำการทดลองซ้ำ

3.2.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญและสรีรวิทยา

- ตรวจสอบลักษณะเซลล์โดยการย้อมสีแกรม (ภาคผนวก ก ข้อ 2.2) ; (Hucker และ Conn, 1923) และย้อมสีแฟลกเจลลา (Forbes, 1981) และวัดขนาดเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ว่ามีรูปร่างสัณฐานเป็นอย่างไร รวมทั้งทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และตรวจสอบลักษณะขยงโคโลนีที่เจริญบนอาหารวุ้น GEY-$CaCO_3$ (ภาคผนวก ก ข้อ 1.2) หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชม.ที่ 30 °ซ.

- ทดสอบการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารวุ้น GYC แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.19) ผลบวกคือ จะทำให้อาหารที่ใช้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ถ้าไม่สร้างรงควัตถุสีน้ำตาล แสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Asai และคณะ, 1964)

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

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

- ทดสอบการเจริญบนอาหารวุ้น MGYP (Mannitol Glucose Yeast extract Peptone agar) ของเชื้อโดยนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารวุ้น MGYP แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.15) ผลบวกคือ เชื้อสามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้ ถ้าไม่เจริญแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Asai และคณะ, 1964)

- ทดสอบการเจริญที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 7.5 และ 8.0 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน ในอาหารเหลว GYPG (ภาคผนวก ก ข้อ 1.4) ซึ่งถ้าเชื้อเจริญได้สังเกตได้จากลักษณะขุ่นของอาหารที่เกิดขึ้น แสดงว่าให้ผลการทดสอบเป็นบวก แต่ถ้าอาหารยังคงใสก็แสดงว่าเชื้อไม่สามารถเจริญ หรือให้ผลลบกับการทดสอบ และการเจริญที่อุณหภูมิ 37 และ 40 °ซ. บนอาหารแข็ง

GYPG การสังเกตผลก็เหมือนกับเลี้ยงในอาหารเหลว คือถ้าเชื้อเจริญเป็นโคโลนีขึ้นได้ก็ให้ผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าเชื้อไม่เจริญ ก็ให้ผลการทดสอบเป็นลบ (ภาคผนวก ก ข้อ 1.3) (Asai และคณะ, 1964)

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

3.2.2.2 ลักษณะทางชีวเคมี ทำการทดสอบลักษณะต่างๆ ดังนี้

- การสร้างเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test) โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้บนอาหารวุ้น GYPG (ภาคผนวก ก ข้อ 1.3) เป็นเวลา 24 ชม. ที่ 30 °ซ. ทำการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 3% ปริมาณ 1-2 หยดลงบนโคโลนีหากเกิดฟองแก๊สแสดงว่าให้ผลเป็นบวก เชื้อนั้นสามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้ ถ้าไม่มีฟองแก๊สแสดงว่าผลเป็นลบ นั่นก็คือเชื้อนั้นไม่สามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลส (ภาคผนวก ก ข้อ 2.4) ; (Cowan, 1993)

- การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอะซิเตท (Oxidation of acetate) เป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทำการเขี่ยเชื้อลงในอาหารเหลว SBYP แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.10) ในอาหารจะมีโบรโมไทมอลบลูเป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งมีช่วงการเปลี่ยนสีอยู่ระหว่างค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 6.0-7.6 หากอินดิเคเตอร์เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าให้ผลเป็นบวกหรือเบสิค (Basic) แต่ถ้าอินดิเคเตอร์ไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าให้ผลเป็นลบหรือแอซิด (Acid) (Asai และคณะ, 1964)

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

- ทดสอบการสร้างกรดกลูโคนิค (ภาคผนวก ก ข้อ 2.4)โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว GY แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.12) ภายหลังจากการทดสอบโดยการหยดด้วย สารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ (Ferric chloride) 1.5% ถ้าให้สีน้ำตาลเข้มจะให้ผลเป็นบวก แต่ถ้ายังคงเป็นสีของสารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ ซึ่งเป็นสีเหลืองส้มจะให้ผลเป็นลบ (Gossele และคณะ, 1980)

- ทดสอบการสร้างกรดดีไดกลูโคนิค 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) ภายหลังทำให้เกิดปฏิกิริยาสามารถตรวจสอบได้ว่าเป็นกรดดีไดกลูโคนิคชนิดใด โดยเทียบกับผลตามที่ Gossele และคณะ (1980) ได้รายงานไว้ (ภาคผนวก ก ข้อ 2.6)

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

- ทดสอบการสร้างสารไดไฮดรอกซีอะซิโตน (Dihydroxyacetone) จากกลีเซอรอล โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารวุ้น GGY แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.16 เมื่อหยดสารละลายเฟห์ลิ่ง (Fehling's solution) (ภาคผนวก ก ข้อ 2.6) ลงบนโคโลนีแล้วหากเกิดสีส้มรอบๆ โคโลนีแสดงว่าให้ผลบวก ถ้าไม่เปลี่ยนแปลงแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Asai และคณะ, 1964)

- การสร้างอะซิติล เมทธิล คาร์บินอล (Acetyl methyl carbinol) จากแคลเซียมแลคเตท นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว CY แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.17) เมื่อทำการทดสอบตามภาคผนวก ก ข้อ 2.8 จะให้สีชมพูถึงแดงแสดงว่าให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (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 (Starch) 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) นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว CBY แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน (ภาคผนวก ก ข้อ 1.18) ในอาหารจะมีโบรโมครีซอลเพอร์เพิลเป็นอินดิเคเตอร์ซึ่งจะมีช่วงการเปลี่ยนสีอยู่ระหว่างค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.2-6.8 ซึ่งถ้าเชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนนั้นๆ ได้จะมีการผลิตกรดออกมาทำให้เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์เป็นเหลือง แสดงว่าให้ผลเป็นบวก ถ้าเชื้อสามารถไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนนั้นๆ ก็จะไม่มีการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ยังคงเป็นสีม่วงแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (Asai และคณะ, 1964)

3.3 การศึกษาระบบยูบิควิโนน (Ubiquinone system)

นำเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียตัวแทนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1.3 ของวิธีดำเนินงานวิจัย จากแต่ละสายพันธุ์เลี้ยงในอาหารเหลว GEPY 4 มล. (ภาคผนวก ก ข้อ 1.22) ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 30 มล. บ่มไว้เป็นเวลา 2 วันที่ 30 °ซ. และนำไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเหลว GG ปริมาตร 200 มล. (ภาคผนวก ก ข้อ 1.23) บรรจุในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ระบบยูบิควิโนน (ภาคผนวก ก ข้อ 2.9) โดยสกัดสารยูบิควิโนนจากเซลล์ด้วยคลอโรฟอร์ม : เมธานอล ในอัตราส่วน 2:1 และแยกโดยวิธีทางโครมาโตกราฟี เปรียบเทียบค่า R_f ของสารยูบิควิโนนที่สกัดได้กับสารมาตรฐาน (Yamada และคณะ, 1968)

ภายหลังจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ นำเชื้อ 1 สายพันธุ์ของแต่ละกลุ่มไปตรวจสอบลักษณะเซลล์ด้วย SEM (Scanning electron microscope) โดยใช้กำลังขยาย 10,000 เท่า (ภาคผนวก ก ข้อ 2.10) ; (De Man และคณะ, 1986)

3.4 การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดอะซิติกหรือผลิตเซลลูโลสปริมาณสูง

3.4.1 นำเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชม. 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 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นวัดเปอร์เซ็นต์กรดที่ได้ (ภาคผนวก ก ข้อ 2.1) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อที่ผลิตกรดได้สูง 5 สายพันธุ์แรก มาศึกษาปัจจัยเบื้องต้นที่มีผลต่อการผลิตกรดอะซิติกต่อไป

3.4.2 การคัดเลือกอะซิติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส ทำโดยนำอาหารที่ได้ลงตัวอย่างของผลไม้ และทำการแยกเชื้อแล้ว มาบ่มต่อไปที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 14 วัน ถ้าสังเกตเห็นชั้นของวุ้นหรือเซลลูโลสที่ผิวหน้าอาหารให้นำเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ โดยเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.6) แล้วนำโคโลนีเดี่ยวมา Streak ซ้ำบนอาหารวุ้นสูตรน้ำมะพร้าวอีกครั้งหนึ่ง เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วจึงเก็บรักษาเชื้อไว้ในหลอดอาหารวุ้น GYPG (ภาคผนวก ก ข้อ 1.3) เพื่อศึกษาต่อไป และอีกส่วนหนึ่งนำโคโลนีเดี่ยวของแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงเพื่อดูความสามารถในการผลิตเซลลูโลสในหลอดขนาด 30 มล. ซึ่งบรรจุอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.7) หลอดละ 15 มล. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูง 6 สายพันธุ์แรกมาศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเซลลูโลสในขั้นตอนต่อไป โดยการใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์วัดความหนาของชั้นเซลลูโลสที่เชื้อผลิตได้ ภายหลังจากหมักไว้ 1 สัปดาห์

3.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะซิติก

นำเชื้อตัวแทนที่สามารถผลิตกรดอะซิติกปริมาณสูงที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 3.4.1) 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. มาศึกษาปัจจัยเบื้องต้นที่ทำให้เชื้อสามารถผลิตกรดอะซิติกสูงสุดตามลำดับดังนี้

3.5.1 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 (ข้อ 4.1) 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

3.5.2 ศึกษาปริมาณกรดอะซิติกที่เหมาะสม

ภายหลังจากได้ปริมาณเอธานอลที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.1 แล้ว นำเชื้อทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ทั้ง 6 สายพันธุ์มาศึกษาปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด โดยเตรียมอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ที่เติมเอธานอลในปริมาณที่เหมาะสมจากการคัดเลือกใน ข้อ 3.5.1 แล้วแปรปริมาณ กรดอะซิติกเข้มข้น 99.8% (Glacial acetic acid) เป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 % v/v ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 โดยสุ่มตัวอย่างน้ำหมัก 10 มล. ทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์กรดที่สร้างได้โดยวิธีไตเตรท (Titration method) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยจะใช้ค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่ผลิตได้ในวันที่ 3 ของการหมักเป็นเกณฑ์ในการตัดสินว่าจะเลือกการเติมกรดอะซิติกที่ระดับใด เพื่อศึกษาการปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดในข้อต่อไป โดยวางแผนการทดลองด้วย Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.5.3 ศึกษาปริมาณกรดคาซามิโนที่เหมาะสม

ภายหลังจากได้ปริมาณเอธานอลและกรดอะซิติกที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.1-3.5.2 แล้ว นำเชื้อทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ทั้ง 6 สายพันธุ์ มาศึกษาปริมาณกรดคาซามิโน (Casamino acid) เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด โดยเตรียมอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ที่เติมเอธานอลและกรดอะซิติกในปริมาณที่เหมาะสมภายหลังจากการศึกษา ข้อ 3.5.1-3.5.2 แล้วแปรปริมาณกรดคาซามิโนเป็น 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1% w/v ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1-3.5.2 โดยสุ่มตัวอย่างน้ำหมัก 10 มล. ทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาเบอร์เซ็นต์กรดที่สร้างได้โดยวิธีไตเตรท (Titration method) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยจะใช้ค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่ผลิตได้ในวันที่ 3 ของการหมักเป็นเกณฑ์ในการตัดสินว่าจะเลือกการเติมกรดคาซามิโนที่ระดับใด เพื่อศึกษาการปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดในข้อต่อไป โดยวางแผนการทดลองด้วย Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.5.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมัก

ภายหลังจากได้ปริมาณเอธานอล กรดอะซิติก และกรดคาซามิโนที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.1-3.5.3 แล้วนำเชื้อทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ รวมทั้งเชื้อ *Acetobacter pasteurianus* TISTR 1056^{T} ในขั้นตอนนี้จึงมีเชื้อที่นำมาศึกษาทั้งหมด 7 สายพันธุ์ นำเชื้อมาศึกษาโดยเลี้ยงในอาหารเหลว EY (ภาคผนวก ก ข้อ 1.5) ที่เติมเอธานอล กรดอะซิติก และกรดคาซามิโน ในปริมาณที่เหมาะสมภายหลังจากการศึกษา ข้อ 3.5.1-3.5.3 แล้วแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักเป็น 30, 37 และ 40 °ซ. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1-3.5.3 โดยสุ่มตัวอย่างน้ำหมัก 10 มล. ทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์กรดที่สร้างได้โดยวิธีไตเตรท (Titration method) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยจะใช้ค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่ผลิตได้ในวันที่ 3 ของการหมักเป็นเกณฑ์ในการศึกษาว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตกรดได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกันอย่างไร โดยวางแผนการทดลองด้วย Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

จากนั้นนำผลการผลิตกรดของทุกสายพันธุ์ที่ได้ในวันที่ 3 ของการหมักที่ 37 และ 40 °ซ. มาคำนวณค่าการหมักสัมพัทธ์ (Relative fermentation) เมื่อเทียบกับการหมักที่ 30°ซ. ดังสมการ

ค่าการหมักสัมพัทธ์ = (ปริมาณกรดที่ผลิตได้ที่อุณหภูมิใดๆ / ปริมาณกรดที่ผลิตได้ที่ 30 °ซ.) x 100

3.6 ศึกษาปริมาณการผลิตเซลลูโลส

นำเชื้อตัวแทนที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณสูง (จากข้อ 3.4.2) จำนวน 6 สายพันธุ์ รวมทั้งสายพันธุ์ *Gluconoacetobacter xylinus* TISTR 893 มาศึกษาการผลิตเซลลูโลสและเปรียบเทียบผลในด้านต่างๆ ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก ข้อ 1.7) โดยปรับค่า TSS ของน้ำมะพร้าวเริ่มต้นให้เป็น 5 °B ด้วยเครื่องแฮนดีรีแฟรกโตมิเตอร์แล้วถ่ายเชื้อ 1 ลูป ลงไปในอาหารดังกล่าว ภายในหลอดทดลองขนาด 30 มล. 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)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย