บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

การศึกษาเกี่ยวกับอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย เริ่มต้นในสมัยปลายศตวรรษที่ 18 โดยหลุยส์ ปาสเตอร์ เป็นบุคคลแรก ต่อมาก็ได้มีการศึกษา ทั้งการแยก การพิสูจน์เอกลักษณ์ และการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้เรื่อยมาไม่ว่าจะเป็นในประเทศไทย ญี่ปุ่น หรือแม้แต่ในประเทศแถบยุโรปและอเมริกาก็ตาม (สมศรี ลีปิพัฒนวิทย์, 2531 ; Mori และ Harada, 1973 ; Yamada และคณะ, 1976a, b ; Gillis และ De Ley, 1980 ; Gossele และคณะ, 1983 ; Yamada และคณะ, 1983 ; Yamada และ Kondo, 1984 ; Minakami และคณะ, 1984 ; Entani และคณะ, 1985 ; Uhlig และคณะ, 1986 ; Mason และ Claus, 1989; Urakami และคณะ, 1989 ; Toyosaki และคณะ, 1995 ; Saeki และคณะ, 1997) เป็นต้น

1. ประวัติการศึกษาอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย (History of acetic acid bacteria)

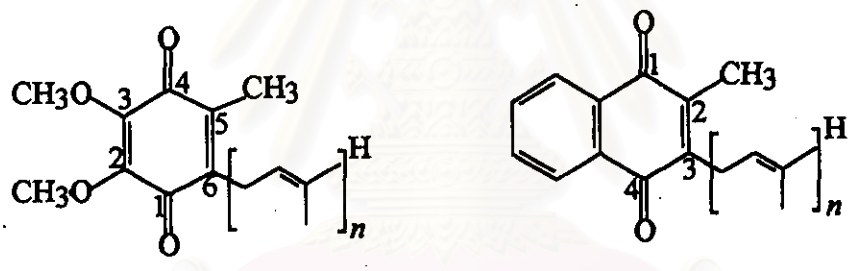
1.1 การจัดจำแนกเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย (Classification of acetic acid bacteria)

ในปี ค.ศ. 1898 Beijerink ได้พบเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* ต่อมาในปี ค.ศ. 1925 Kluyver ได้พบเชื้อ "*Gluconobacter suboxydans*" จากนั้นในปี ค.ศ. 1935 Asai ได้จัดอะซิติกแอซิดแบคทีเรียออกเป็น 2 สกุล คือ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ตามลักษณะความแตกต่างของการออกซิไดส์อะซิเตท ซึ่งสกุล *Acetobacter* สามารถออกซิไดส์อะซิเตทได้ ส่วนสกุล *Gluconobacter* ไม่มีความสามารถในการออกซิไดส์ (Yamada และคณะ, 1969a)

Leifson (1954) ได้จำแนกเชื้อกลุ่มนี้ใหม่เป็น 2 สกุล คือ *Acetobacter* สำหรับเชื้อกลุ่มที่สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและมีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบรอบเซลล์ (Peritrichous flagella) และสกุล *Acetomonas* ซึ่งมีแฟลกเจลลาแบบขั้วเซลล์ (Polar flagella) และไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเตท ต่อมาในปี ค.ศ. 1958 Asai และ Shoda ได้ย้อมแฟลกเจลลา และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่นๆ พบว่าเชื้อสกุลที่ Leifson จำแนกใหม่นั้นก็คือสกุล *Gluconobacter* ดังนั้นจึงไม่จัดว่า *Acetomonas* เป็นสกุลใหม่ (Asai และคณะ, 1964)

นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 1961 Asai และ Shoda ได้พบเชื้อ "*Gluconobacter liquefaciens*" G-1 เพราะมีลักษณะแฟลกเจลลาเป็นแบบขั้วเซลล์ แต่มีความสามารถในการออกซิไดส์อะซิเตท อย่างไรก็ตาม ในปี ค.ศ. 1959 Shimwell และ Carr และ ในปี ค.ศ. 1960 Stouthamer ได้ตรวจสอบการย้อมแฟลกเจลลาของเชื้อ "*Gluconobacter liquefaciens*" G-1 อีกครั้งพบว่าเป็นชนิดรอบเซลล์ ดังนั้นจึงจัดเชื้อนี้เป็น "*Acetobacter liquefaciens*" ซึ่งเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตสีน้ำตาลได้ (Asai และคณะ, 1964)

Yamada และคณะ (1968) ได้ศึกษาระบบยูบิควิโนนในเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียพบว่าเชื้อ *Acetobacter* มีระบบยูบิควิโนนที่มีไอโซปรีน (Isoprene) 9 ยูนิต (Q-9) แต่สกุล *Gluconobacter* มี 10 ยูนิต (Q-10) นอกจากนี้ Yamada และคณะ (1968b) ยังได้ศึกษาระบบยูบิควิโนนของเชื้อ "*Acetobacter xylinum*" พบว่าเป็นชนิด Q-10 ไอโซปรีนอยด์ ควิโนน (Isoprenoid quinone) (รูปที่ 2.1) ที่พบในแบคทีเรียนั้นเป็นองค์ประกอบอยู่บริเวณพลาสมาเมมเบรน (Plasma membrane) และมีความสำคัญในกระบวนการขนถ่ายอิเล็คตรอน (Electron transport) รวมทั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ ฟอสโฟรีเลชั่น (Oxidative phosphorylation) โดยในแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยยูบิควิโนน (Ubiquinone) ส่วนพวกแกรมบวกเป็นเมนาควิโนน (Menaquinone) และในปีเดียวกัน Gibbs และ Shapton (1968) ได้จำแนก *Acetobacter* โดยอาศัยข้อมูลด้านชีวเคมีเป็น 8 สปีชีส์ คือ *A. aceti*, "*A. xylinum*", "*A. mesoxydans*", "*A. lovaniensis*", "*A. ransens*", "*A. ascendens*", "*A. peroxydans*" และ "*A. paradoxus*"



Ubiquinone (Q-*n*) **Menaquinone (MK-*n*)**

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารพวกไอโซปรีนอยด์ ควิโนน

ที่มา : Collins และ Jones, 1981.

De Ley และ Frateur (1974) ได้จำแนก *Acetobacter* เป็น 3 สปีชีส์ คือ *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* และ "*A. peroxydans*" โดยอาศัยความสามารถในการสร้างสารอะซิติล เมทธิล คาร์บินอล การสร้างกรด 5-คีโตกลูโคนิคเป็นต้น (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ลักษณะของเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย จีนัส *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter* และ *Acidomonas*

Characteristics	*Gluconobacter* [1]			*Acetobacter aceti* [2]		*Acetobacter pasteurianus* [3]					*Acetobacter* [4]		*Gluconoacetobacter* [5]					*Acidomonas methanolica* [6]
	oxydans	*cerinus*	*frateurii*	subsp. *orleanensis*	subsp. *aceti*	subsp. *pasteurianus*	subsp. *lovaniensis*	subsp. *estunensis*	subsp. *ascendens*	subsp. *paradoxus*	*peroxydans*	*polyoxogenes*	*europaeus*	*xylinus*	*hansenii*	*liquefaciens*	*diazotrophicus*	
Flagellation	polar / none			peritrichous / none		peritrichous / none					peritrichous / none		peritrichous or none					none
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate / lactate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	ND	d	d	d	d	-
Ketogenesis from glucose	+	+	+	d	d	d	d	d	d	d	-	-	ND	+	+	+	d	+
Ubiquinone type (major part)	Q-10	Q-10	Q-10	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10
Acetyl methyl carbinol (VP-test)	ND	ND	ND	-	-	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Brown pigment formation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	+	+	-
Gluconic acid formation	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	ND	+	+	+	ND	ND
Growth on ribitol	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Growth on arabitol	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

d= some strains positive, ND= No Data

[1] มาจาก Mason และ Claus (1989), Holt (1994)

[2] มาจาก De Ley และ Frateur (1974), De Ley และคณะ (1984), Holt (1994)

[3] มาจาก De Ley และ Frateur (1974), De Ley และคณะ (1984), Holt (1994)

[4] มาจาก De Ley และ Frateur (1974), Holt (1994)

[5] มาจาก De Ley และคณะ (1984), Gillis และคณะ (1989), Yamada และคณะ (1997)

[6] มาจาก Uhlig และคณะ (1986), Urakami และคณะ (1989), Holt (1994)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Characteristics	*Gluconobacter* [1]			*Acetobacter aceti* [2]		*Acetobacter pasteurianus* [3]					*Acetobacter* [4]		*Gluconoacetobacter* [5]					*Acidomonas methanolica* [6]
	oxydans	*cerinus*	*frateurii*	subsp. *orleanensis*	subsp. *aceti*	subsp. *pasteurianus*	subsp. *lovaniensis*	subsp. *estunensis*	subsp. *ascendens*	subsp. *paradoxus*	*peroxydans*	*polyoxogenes*	*europaeus*	*xylinus*	*hansenii*	*liquefaciens*	*diazotrophicus*	
2-ketogluconic acid formation	+	+	+	+	+	d	d	d	d	d	ND	ND	ND	+	d	d	+	d
5-ketogluconic acid formation	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	d	+	d	+	-	-
2,5-diketogluconic acid formation	d	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	-	-	+	+	-
Cellulose formation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	+	-	-	-	-
Growth on D-mannitol agar	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	d	d	d	d	d	-
Growth on D-sorbitol agar	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-
Growth on glutamate agar	-	-	-	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	-
Growth on Hoyer-Frateur agar	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	d	d	d	d	d	-
Growth without acetic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Growth on 4-8% acetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	ND

d= some strains positive, ND= No Data

[1] มาจาก Mason และ Claus (1989), Holt (1994)

[2] มาจาก De Ley และ Frateur (1974), De Ley และคณะ (1984), Holt (1994)

[3] มาจาก De Ley และ Frateur (1974), De Ley และคณะ (1984), Holt (1994)

[4] มาจาก De Ley และ Frateur (1974), Holt (1994)

[5] มาจาก De Ley และคณะ (1984), Gillis และคณะ (1989), Yamada และคณะ (1997)

[6] มาจาก Uhlig และคณะ (1986), Urakami และคณะ (1989), Holt (1994)

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Characteristics	*Gluconobacter* [1]			*Acetobacter aceti* [2]		*Acetobacter pasteurianus* [3]					*Acetobacter* [4]		*Gluconoacetobacter* [5]					*Acidomonas methanolica* [6]
	oxydans	*cerinus*	*frateurii*	subsp. *orleanensis*	subsp. *aceti*	subsp. *pasteurianus*	subsp. *lovaniensis*	subsp. *estunensis*	subsp. *ascendens*	subsp. *paradoxus*	*peroxydans*	*polyoxogenes*	*europaeus*	*xylinus*	*hansenii*	*liquefaciens*	*diazotrophicus*	
Growth on 10% acetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	ND
Growth at pH 2.5 in acetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	ND	-
Growth without ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	ND	+	+	+	ND	+
Growth on 10% ethanol	-	-	-	d	d	d	d	d	d	d	d	-	ND	-	-	-	-	-
Growth on 30% glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	+	-
Growth on methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
N_2 fixation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	+	-
DNA base composition (mol% G+C)	58.1-62.8	54.2-57.6	59	56-60		53-63	ND	ND	ND	ND	ND	57.6-58.1	56-58	55-63	58-63	62-65	61-63	63-66
γ - pyrones from fructose	d	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	+	+	-

d= some strains positive, ND= No Data

[1] มาจาก Mason และ Claus (1989), Holt (1994)

[2] มาจาก De Ley และ Frateur (1974), De Ley และคณะ (1984), Holt (1994)

[3] มาจาก De Ley และ Frateur (1974), De Ley และคณะ (1984), Holt (1994)

[4] มาจาก De Ley และ Frateur (1974), Holt (1994)

[5] มาจาก De Ley และคณะ (1984), Gillis และคณะ (1989), Yamada และคณะ (1997)

[6] มาจาก Uhlig และคณะ (1986), Urakami และคณะ (1989), Holt (1994)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Gillis และ De Ley (1980) ได้ศึกษาความคล้ายคลึงกันของ intra- และ intergeneric ของ rRNA cistrons ของ *Acetobacter* และ *Gluconobacter*

Yamada และคณะ (1981) ได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในเซลล์ (Cellular fatty acid) ของอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย โดยวิเคราะห์ด้วยแก๊ส ลิควิด โครมาโตกราฟี (Gas liquid chromatography) พบว่ามีกรดไขมันชนิด $C_{18:1}$ เป็นส่วนใหญ่ ต่อมาในปี ค.ศ. 1983 ได้จัด "*Acetobacter aceti* subsp. *liquefaciens*" เป็น "*Acetobacter liquifaciens*" โดยอาศัยผลการวิเคราะห์ระบบยูบิควิโนน ซึ่งเป็นชนิด Q-10 รวมทั้งข้อมูลด้าน DNA-DNA hybridization และรูปแบบของอิเลคโตรโฟไลติกของเอนไซม์ชนิดต่างๆ

Yamada (1983) ได้จัด "*A. aceti* subsp. *xylinum*" เป็น "*A. xylinus*" เพราะมีความสามารถในการออกซิไดส์อะซิเตท และมีระบบยูบิควิโนนชนิด Q-10 รวมทั้งสามารถผลิตเซลลูโลสได้ ต่อมายังได้จัด *Gluconoacetobacter* เป็น subgenus ของสกุล *Acetobacter* ที่มีความสามารถในการออกซิไดส์อะซิเตท และมีระบบยูบิควิโนนชนิด Q-10 โดยจัด "*Acetobacter liquefaciens*" เป็น "*Acetobacter* (*Gluconoacetobacter*) *liquefaciens*" และ "*Acetobacter xylinus*" เป็น "*Acetobacter* (*Gluconoacetobacter*) *xylinum*" นอกจากนี้ Gossele และคณะ (1993) ยังได้ศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ และ Protein gel electrophoregrams ของเชื้อ *Acetobacter*

De Ley และคณะ (1984)ได้จำแนก *Acetobacter* ออกเป็น 4 สปีชีส์ คือ *Acetobacter aceti*, "*A. liquefaciens*", *A. pasteurianus* และ "*A. hansenii*" โดยอาศัยเกณฑ์ในการจัดหลายประการ เช่นความสามารถในการสร้างสารอะซิติล เมทธิล คาร์บินอล การสร้างกรด 5-คีโตกลูโคนิค การสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล (ตารางที่ 2.1)

Micales และคณะ (1985) ได้ศึกษา DNA-DNA homology ของเชื้อ *Gluconobacter* และ Gossele และ Swings (1985) ได้ศึกษาการแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อที่ผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวพบว่ามีบางสายพันธุ์เป็น "*Acetobacter hasenii*" นอกจากนี้ Entani และคณะ (1985) ได้พบ *Acetobacter* สายพันธุ์ใหม่ คือ "*Acetobacter polyoxogenes*" ซึ่งสามารถหมักน้ำส้มสายชูได้ความเข้มข้นสูงเนื่องจากสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกรดอะซิติก 10%

Uhlig และคณะ (1986) ได้พบอะซิติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ "*A. methanolicus*" ซึ่งแยกได้จากกระบวนการหมักเซลล์ยีสต์โดยใช้เมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

Gillis และคณะ (1989) ได้พบอะซิติกแอซิดแบคทีเรียชนิดใหม่ คือ "*A. diazotrophicus*" ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixing) โดยแยกได้จากต้นอ้อย Mason และ Claus (1989) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางฟีโนไทป์ และ DNA sequence similarities ของเชื้อ *Gluconobacter* ทั้ง 3 สปีชีส์ คือ *G. oxydans*, *G. frateurii* และ *G. cerinus* พบว่ามีลักษณะที่แตกต่างกันตามแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้ Urakami และคณะ (1989) ได้จัด "*Acetobacter methanolicus*" เป็นสกุลใหม่ คือ *Acidomonas methanolica* โดยอาศัยข้อมูลทั้งทางด้านฟีโนไทป์ และจีโนไทป์

Bulygina และคณะ (1992) ได้ศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ *Acidomonas*, *Acetobacter* และ *Gluconobacter* โดยใช้ 5S ribosomal RNA sequencing และยืนยันผลของ Urakami (1989) ว่าจัด "*Acetobacter methanolicus*" อยู่ใน *Acidomonas methanolica* ส่วน Sievers และคณะ (1992) ได้พบอะซิติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ "*Acetobacter europaeus*" โดยอาศัยลักษณะต่างๆ รวมทั้งลักษณะด้าน DNA-DNA hybridization เชื้อนี้ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำส้มสายชูในประเทศเยอรมัน

Holt (1994) ได้จำแนกอะซิติกแอซิดแบคทีเรียไว้ 3 สกุล คือ *Acetobacter*, *Acidomonas* และ *Gluconobacter* ส่วน Seivers และคณะ (1994) ได้ศึกษา 16S rRNA sequencing จาก "*A. methanolicus*" หรือ *Acidomonas methanolica* ที่ Urakami ได้จัดใหม่นั้น จากการศึกษาเห็นว่าควรจัด *Acidomonas methanolica* เป็น "*Acetobacter methanolicus*" เหมือนเดิม

Sievers และคณะ (1995) ได้ศึกษา 16S rRNA sequencing ของ *Gluconobacter* 4 สายพันธุ์ ดังนี้ "*G. asaii*", *G. cerinus*, *G. frateurii* และ *G. oxydans*

Yamada และคณะ (1997) ได้ศึกษา 16S rRNA sequencing ในช่วงตำแหน่งที่ 1,200-1,375 ในกลุ่ม *Acetobacter*, *Gluconobacter* และ *Acidomonas* และจากข้อมูลทางฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ จึงได้จัดเชื้อใหม่ดังนี้ "*A. xylinum*" เป็น *Gluconoacetobacter xylinus*, "*A. liquefaciens*" เป็น *Gluconoacetobacter liquefaciens*, "*A. diazotrophicus*" เป็น *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, "*A. hansenii*" เป็น *Gluconoacetobacter hansenii* และ "*A. europaeus*" เป็น *Gluconoacetobacter europaeus* โดยอาศัยผลการวิเคราะห์ระบบยูบิควิโนน การเจริญและผลิตกรดจากเมธานอลและซอร์บิทอล (ตารางที่ 2.1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 ลักษณะของเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย (Characterization of acetic acid bacteria)

อะซิติกแอซิดแบคทีเรียจัดอยู่ในตระกูล Acetobacteraceae มีลักษณะเซลล์กลมรี จนถึงรูปร่างเป็นท่อน การเรียงตัวของเซลล์มีหลายลักษณะ อาจพบเซลล์อยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่ เรียงตัวเป็นสายยาว หรือเป็นสายสั้นๆไม่พบเอนโดสปอร์ (Endospore) เซลล์ติดสีแกรมลบ แต่เมื่อเซลล์อายุมากขึ้นอาจย้อมติดแกรมบวกบ้างเนื่องจากผนังเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป เชื้อกลุ่มนี้ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาชนิดรอบเซลล์หรือขั้วเซลล์ ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ (Pigment) แต่เมื่อมาอยู่รวมกันมากๆ อาจเห็นเป็นสีชมพูของสารพอร์ไฟริน (Porphyrin) บางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล เชื้อกลุ่มนี้ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (Obligate aerobe) เพราะไม่สามารถใช้สารอื่นนอกจากออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้ายในกระบวนการเปลี่ยนอาหารให้เป็นพลังงาน ภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อนี้จะแตกต่างกัน ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ 15-34 °ซ. ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.4-6.3 เจริญได้เล็กน้อยที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 7-8 (De Ley และ Frateur, 1974) มีผู้รายงานว่าพบเชื้อนี้ในผลไม้ น้ำส้มสายชู น้ำตาลสด น้ำตาลเมา กระแช่ ลูกแป้ง (นภา ไล่ห์ทอง, 2520) ปัจจุบันอะซิติกแอซิดแบคทีเรียแบ่งได้เป็น 4 สกุล ดังนี้ (Yamada และคณะ, 1997 ; Stackebrandt, 1998)

1.2.1 *Acetobacter*

ลักษณะของสกุลนี้คือ สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท มีระบบยูบิควิโนนเป็นชนิด Q-9 ไม่เจริญในอาหารที่มีซอร์บิทอลหรือเมธานอลเป็นองค์ประกอบ จากตารางที่ 2.1 เชื้อสกุล *Acetobacter* แบ่งออกเป็น 5 สายพันธุ์ ได้แก่

- *A. aceti* ซึ่งแบ่งเป็น 2 subspecies ได้แก่ *A. aceti* subsp. *aceti* และ *A. aceti* subsp. *orleanensis* ซึ่งทั้งสองนั้นมีลักษณะที่แตกต่างกันคือ การเจริญได้บนอาหารวุ้นโฮเยอร์-เฟรเทอร์ (Hoyer-Frateur agar) โดย *A. aceti* subsp. *aceti* จะให้ผลเป็นบวกส่วน *A. aceti* subsp. *orleanensis* จะให้ผลเป็นลบ

- *A. pasteurianus* ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 subspecies ได้แก่ *A. pasteurianus* subsp. *pasteurianus*, *A. pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *A. pasteurianus* subsp. *estunensis*, *A. pasteurianus* subsp. *ascendens* และ *A. pasteurianus* subsp. *paradoxus* โดยอาศัยเกณฑ์ในการจัดหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเจริญบนอาหารวุ้นโฮเยอร์-เฟรเทอร์ การผลิตกรดกลูโคนิค การทดสอบแคตาเลส เป็นต้น

- *A. peroxydans*,
- "*A. polyoxogenes*"
- "*A. methanolicus*"

1.2.2 *Gluconobacter*

ลักษณะของสกุลนี้คือ มีระบบยูบิควิโนนชนิด Q-9 ไม่สามารถออกซิไดส์อะซิเตทและแลคเตท แต่สามารถผลิตกรดจากซอร์บิทอลและแมนนิทอล (Yamada และคณะ, 1997) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตกรดกลูโคนิคจากกลูโคส (Asai, 1968) เชื้อนี้เจริญได้ไม่ดีในอาหารที่มีเอธานอลเป็นองค์ประกอบ ตารางที่ 2.1 แบ่งเชื้อ *Gluconobacter* ได้เป็น 3 สายพันธุ์ คือ *G. oxydans*, *G. cerinus* และ *G. frateurii* โดยอาศัยเกณฑ์ในการจัด คือ DNA-DNA homology รวมทั้งการศึกษาความสามารถในการเจริญบนอาหารวุ้นไรบิทอล (Ribitol agar) และอะราบิทอล (Arabitol agar) (Swings, 1992)

1.2.3 *Acidomonas*

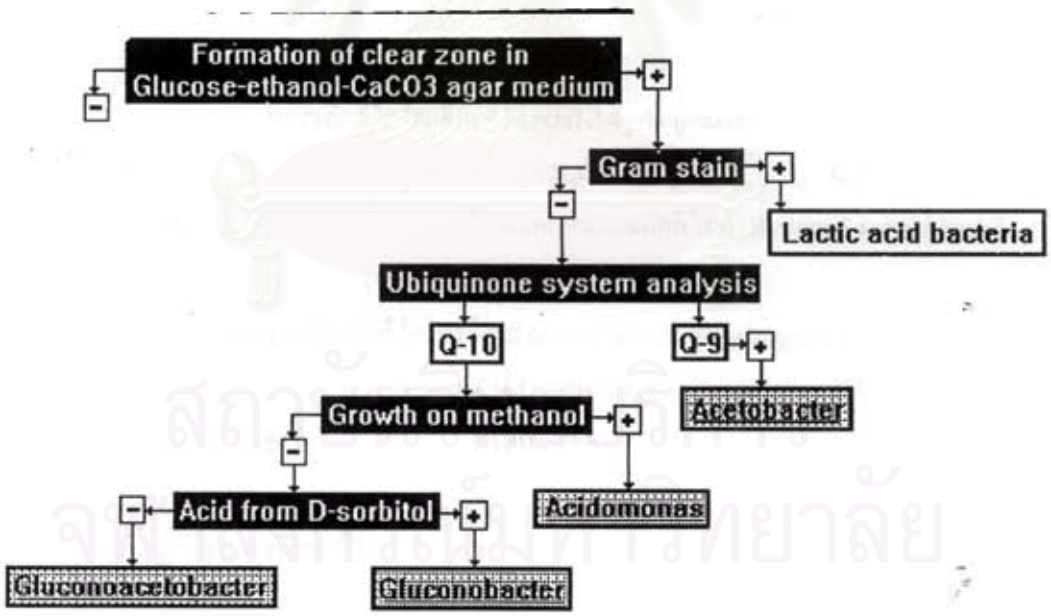
ลักษณะที่สำคัญของเชื้อกลุ่มนี้คือ มีระบบยูบิควิโนนชนิด Q-10 และสามารถเจริญในอาหารที่มีเมธานอลเป็นองค์ประกอบได้แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มี ดี-ซอร์บิทอลและดี-แมนนิทอลเป็นองค์ประกอบ (Yamada และคณะ, 1997) ดังตารางที่ 2.1 สามารถแยกเชื้อสกุลนี้ได้จากกระบวนการหมักยีสต์ (Uhlig และคณะ, 1986)

1.2.4 *Gluconoacetobacter*

ลักษณะที่สำคัญของเชื้อกลุ่มนี้คือ มีระบบยูบิควิโนนชนิด Q-10 และไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่เมธานอลหรือดี-ซอร์บิทอลเป็นองค์ประกอบ (Yamada และคณะ, 1997) เชื้อสกุล *Gluconoacetobacter* นี้แบ่งได้เป็น 5 สายพันธุ์ คือ *Gluconoacetobacter europaeus*, *Gluconoacetobacter xylinus*, *Gluconoacetobacter hansenii*, *Gluconoacetobacter liquefaciens* และ *Gluconoacetobacter diazotrophicus* จากตารางที่ 2.1 พบว่าเชื้อ *Gluconoacetobacter liquefaciens* และ *Gluconoacetobacter diazotrophicus* สามารถผลิตสีน้ำตาล และสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง 2 สายพันธุ์นี้จากผลการสร้างกรด 5-คีโตกลูโคนิค การเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ 30% นอกจากนี้ *Gluconoacetobacter diazotrophicus* มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่นๆ คือสามารถตรึงไนโตรเจนได้ รวมทั้งสามารถเจริญในอาหารที่มีกรดอะซิติกสูงถึง 10% และเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ 2.5 สำหรับสายพันธุ์ *Gluconoacetobacter xylinus* นั้นมีลักษณะที่สำคัญ คือสามารถผลิตเซลลูโลสและเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ เชื้อกลุ่มนี้ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ (Pigment)

2. <u>การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย</u> (Identification of acetic acid bacteria)

การพิสูจน์เอกลักษณ์นั้นมีความสำคัญเพื่อระบุว่าเชื้อที่แยกได้จัดอยู่ในกลุ่มใด Yamada และคณะ (1997) สามารถแยกความแตกต่างของอะซิติกแอซิดแบคทีเรียและแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ปะปนกันจากผลการย้อมแกรมและการทดสอบแคตาเลส โดยอะซิติกแอซิดแอซิดแบคทีเรียจะเป็นประเภทแกรมลบและให้ผลบวกกับการทดสอบแคตาเลส ส่วนแลคติกแอซิดแบคทีเรียให้ผลตรงกันข้าม เมื่อได้เชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียแล้วจะนำมาจัดกลุ่มได้โดยอาศัยการวิเคราะห์ระบบยูบิควิโนน ถ้าสายพันธุ์ใดให้ผลเป็นยูบิควิโนนชนิด Q-9 จะจัดอยู่ในสกุล *Acetobacter* แต่ถ้าเป็นชนิด Q-10 จะนำมาศึกษาความสามารถในการเจริญและผลิตกรดในอาหารที่มีเมธานอลเป็นองค์ประกอบต่อไป โดยถ้าให้ผลเป็นบวกจะจัดอยู่ในสกุล *Acidomonas* แต่ถ้าให้ผลลบจะนำมาศึกษาความสามารถในการเจริญและผลิตกรดในอาหารที่มีซอร์บิทอลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งถ้าให้ผลเป็นบวกจัดอยู่ในสกุล *Gluconobacter* แต่ถ้าให้ผลเป็นลบจะจัดอยู่ในสกุล *Gluconoacetobacter* ซึ่งในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อกลุ่มนี้ในระดับสกุลและสายพันธุ์อาศัยลักษณะที่เป็นรูปวิธาน (Key) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.2



<u>รูปที่ 2.2</u> ลักษณะความแตกต่างระดับสกุลของเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย

<u>ที่มา</u> : Yamada และคณะ, 1997.

3. <u>เมตาบอลิซึมในการผลิตกรดอะซิติกและเซลลูโลสของอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย</u>

(Metabolism of acetic acid and cellulose productions of acetic acid bacteria)

เมตาบอลิซึมที่เกิดขึ้นภายในเซลล์นอกจากเพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์แล้ว สารที่ผลิตได้ระหว่างการเจริญยังได้นำมาใช้ประโยชน์อีกด้วย เช่นกรดอะซิติก และเซลลูโลส เป็นต้น

3.1 การสร้างกรดอะซิติก

ในการสร้างกรดของเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียนั้น เชื้อจะเปลี่ยนเอธานอลเป็นกรดอะซิติกในภาวะที่มีออกซิเจน ดังสมการ (1) (2) และ (3) ในรูป 2.3 (Conner และ Allqeier, 1976)

แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase)

$$CH_3CH_2OH + O_2 \longrightarrow CH_3CHO + H_2O \qquad (1)$$

เอธานอล อะเซตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde)

อะเซตัลดีไฮโดรจีเนส (Acetal dehydrogenase)

$$CH_3CHO + H_2O \longrightarrow CH_3CH(OH)_2 \qquad (2)$$

อะเซตัลดีไฮด์ ไฮเดรตเดดอะเซตัลดีไฮด์ (Hydrated acetaldehyde)

อะเซตัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (Acetaldehyde dehydrogenase)

$$CH_3CH(OH)_2 + O_2 \longrightarrow CH_3COOH + H_2O \qquad (3)$$

ไฮเดรตเดดอะเซตัลดีไฮด์ กรดอะซิติก

หรืออาจเกิดจากปฏิกิริยาแคนนิซซาโร

$$CH_3CHO + CH_3CHO \longrightarrow CH_3COOH + CH_3CH_2OH \qquad (4)$$

อะเซตัลดีไฮด์ กรดอะซิติก เอธานอล

<u>รูปที่ 2.3</u> กลไกการสร้างกรดอะซิติกของอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย

<u>ที่มา</u> : Conner และ Allqeier, 1976.

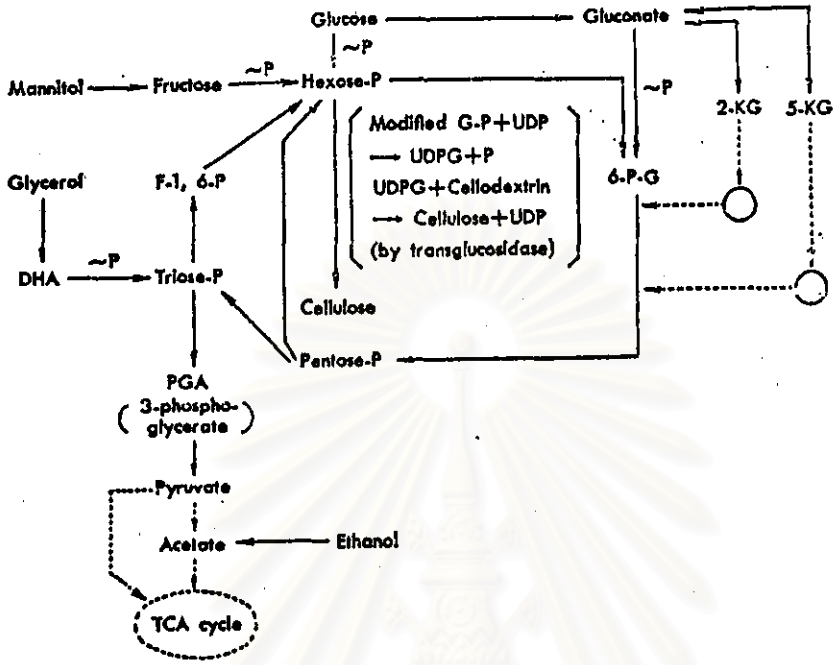
สมการที่ 1 เป็นการออกซิไดส์เอธานอลให้เป็นอะเซตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) โดยใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) ส่วนสมการที่ 2 แบ่งปฏิกิริยาเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกอะเซตัลดีไฮด์รวมกับน้ำเป็นไฮเดรตเดดอะเซตัลดีไฮด์ แล้วไฮเดรตเดดอะซิตัลดีไฮด์ถูกออกซิไดส์และดีไฮโดรจิเนท (Dehydrogenate) เป็นกรดอะซิติกโดยเอนไซม์อะเซตัลดีไฮด์ดีไฮโดรจิเนส (Acetaldehyde dehydorogenase) ทำให้โปรตอน (Proton) 2 ตัวของไฮเดรตเดดอะเซตัลดีไฮด์ถูกส่งผ่านไปสู่อะตอมของออกซิเจน ดังสมการที่ 3 อะซิตัลดีไฮด์ อาจเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้อีกทางหนึ่งโดยอะซิตัลดีไฮด์ 2 โมเลกุลจากสมการที่ 1 ทำปฏิกิริยากันเองได้กรดอะซิติกและเอธานอลดังสมการที่ 4 ซึ่งปฏิกิริยาแบบนี้เรียกว่า ปฏิกิริยาแคนนิซซาโร (Cannizzaro reaction) ส่วนเอธานอลที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่สมการที่ 1 อีกเป็นวัฏจักร จนกระทั่งกลายเป็นกรดอะซิติกทั้งหมด ในทางทฤษฎีพบว่าเอธานอล 1 กรัม สามารถเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้ 1.31 กรัม สรุปดังสมการนี้

$$\underset{\text{เอธานอล}}{C_2H_5OH} + O_2 \longrightarrow \underset{\text{กรดอะซิติก}}{CH_3COOH} + H_2O$$

3.2 การสร้างเซลลูโลส

ส่วนการสร้างเซลลูโลสนั้นพบในสายพันธุ์ *Gluconoacetobacter xylinus* การสร้างเซลลูโลสนั้นมี 2 ขั้นตอน ขั้นแรกโมเลกุลกลูโคสอิสระจะเข้าไปภายในเซลล์และรวมตัวกันเป็นสารเริ่มต้นคือ โพลีกลูแคน (Polyglucan) และจะถูกส่งออกนอกเซลล์ ในขั้นที่ 2 โพลีเมอร์เหล่านี้จะรวมกันเกิดเป็นเส้นใยขนาดเล็ก (Microfibril) ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ในภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ (Colvin and Beer, 1960) ดังรูปที่ 2.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.4 กลไกการสร้างเซลลูโลสจาก *Gluconoacetobacter xylinus*

ที่มา : Colvin and Beer, 1960.

4. การใช้ประโยชน์ของอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย (Applications of acetic acid bacteria)

ในทางอุตสาหกรรมมีการนำเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้มาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดอะซิติกและการผลิตเซลลูโลส

4.1 การผลิตกรดอะซิติก

การใช้ประโยชน์จากอะซิติกแอซิดแบคทีเรียที่สำคัญคือการผลิตน้ำส้มสายชู น้ำส้มสายชูเป็นอาหารที่ผลิตจากแป้งหรือน้ำตาล โดยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ 2 ครั้ง ครั้งแรกเพื่อเปลี่ยนแป้งหรือน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ ครั้งที่ 2 ทำให้แอลกอฮอล์เปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก หรือน้ำส้มสายชู มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตกรดอะซิติก คือ Hromatka และ Ebner (1959) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในการผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมอร์จ (Submerge fermentation) 2 วิธี วิธีแรกเป็นการเพิ่มปริมาณอากาศที่พ่นลงในสารละลายแอลกอฮอล์ วิธีที่สอง คือลดขนาดของฟองอากาศเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของออกซิเจนใน

การซึมผ่านสู่สารละลาย พบว่าการลดขนาดฟองอากาศให้ผลดีกว่าการเพิ่มปริมาณอากาศเพราะการเพิ่มปริมาณอากาศจะทำให้มีการสูญเสียแอลกอฮอล์และกรดอะซิติกเพิ่มมากขึ้น

Mori และ Harada (1973) ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเจริญของ "*Acetobacter rancens*" S3 และ F11 ซึ่งแยกได้จากน้ำส้มสายชู พบว่าเมื่อเติมกรดคาซามิโน (Casamino acid)0.5% และเอธานอล 2.0% จะทำให้อัตราการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้เจริญได้สูงสุด คือมีค่า OD ที่ 600 นม. เป็น 0.66 และ 0.75 ตามลำดับ

Ohmori และคณะ (1980) ได้ทำการแยกเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียจากน้ำส้มสายชูและผลไม้ เพื่อหาเชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูคือผลิตกรดได้ที่อุณหภูมิสูง ผลการทดลองสรุปว่าเชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสมดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*

Nanba และคณะ (1984) ได้ศึกษาภาวะเสริมกัน (Synergistic effect) ระหว่างกรดอะซิติกและเอธานอลต่อการเจริญของ *Acetobacter* sp. เมื่อมีการเติมกรดอะซิติก 0.5-0.75% ลงในอาหารที่มีเอธานอลเป็นองค์ประกอบจะทำให้อัตราการเจริญเร็วขึ้น และลดระยะ Lag phase ลง

Ationu และคณะ (1988) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณกรดโดยทำการตรึงเซลล์อะซิติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acetobacter aceti* พบว่าการตรึงเซลล์ในเซรามิกและไนลอนจะทำให้มีการผลิตกรดอะซิติกสูงกว่าการตรึงในตาข่ายที่ทำด้วยไม้ 56% และ 30% ตามลำดับ นอกจากนี้ Saeki และคณะ (1997) ได้พัฒนาการใช้เชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงสำหรับการหมักน้ำส้มสายชูที่อุณหภูมิสูงคืออยู่ในช่วงระหว่าง 37-40 °ซ. พบว่าเชื้อที่มีสมบัติดังกล่าวคือ "*Acetobacter rancens* subsp. *pasteurianus*", "*A. lovaniensis* subsp. *lovaniensis*", "*A. aceti subsp. liquefaciens*" และ "*A. xylinum* subsp. *xylinum*" ซึ่งผลการพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อโดยอ้างอิงข้อมูลของ De Ley และ Fratuer (1974) ใน Bergey's Manual of Bacteriology นั้นก่อให้เกิดความสับสน

4.1.1 ประเภทของน้ำส้มสายชู (นภา ไกร์ทอง, 2520)

น้ำส้มสายชูแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ

4.1.1.1 น้ำส้มสายชูหมัก (Fermented vinegar) หมายถึงน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักธัญพืช ผลไม้ หรือน้ำตาลด้วยยีสต์ให้ได้แอลกอฮอล์แล้วหมักต่อด้วยเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย ตัวอย่างน้ำส้มสายชูหมักได้แก่

- Cider vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักน้ำแอปเปิ้ล โดยใช้ยีสต์หมักน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์แล้วเชื้อน้ำส้มสายชูจะหมักแอลกอฮอล์ไปเป็นกรดอะซิติกตามลำดับ ผลิตมากในประเทศสหรัฐอเมริกา

-Malt vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักข้าวบาร์เลย์ที่กำลังงอก ปริมาณแป้งที่มีในวัตถุดิบจะถูกเอนไซม์ไดแอสเตส (Diastase) ที่มีอยู่ในข้าวบาร์เลย์ย่อยแป้งให้เป็น

น้ำตาลแล้วน้ำตาลจะถูกหมักต่อไปเป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์ และแอลกอฮอล์จะถูกหมักต่อไปจนได้กรดอะซิติก

- Grain vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักแบบ 2 ขั้นตอน คือ แป้งจากธัญพืชจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ไดแอสเตสเป็นน้ำตาล เช่นเดียวกับการทำ Malt vinegar

-Wine vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักน้ำองุ่นโดยผ่านการหมักแบบ 2 ขั้นตอนเช่นเดียวกัน พบมากในประเทศแถบยุโรป

-Fruit vinegar เป็นน้ำส้มสายชูหมักที่ทำจากน้ำผลไม้ โดยผ่านกระบวนการหมัก 2 ขั้นตอน น้ำผลไม้ที่นิยมนำมาทำน้ำส้มสายชู ได้แก่ น้ำสับปะรด น้ำมะพร้าว หรือน้ำตาลมะพร้าว

น้ำส้มสายชูหมักจัดเป็นน้ำส้มสายชูที่มีกลิ่นหอมและรสชาติดี โดยจะมีสีแตกต่างกันตามสีของวัตถุดิบที่ใช้ผลิต กลิ่นหอมของน้ำส้มสายชูชนิดนี้ได้จากสารบางชนิดที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก และกลิ่นรสจะดียิ่งขึ้นเมื่อเก็บไว้นานๆ

4.1.1.2 น้ำส้มสายชูกลั่น (Distilled vinegar, Spirit vinegar หรือ White vinegar) เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำสุราขาวเจือจางหรือเอธานอลกลั่นเจือจางมาหมักด้วยเชื้อน้ำส้มสายชูโดยมีการเติมเกลือแร่และอาหารเสริมที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู (นภา โล่ห์ทอง, 2520).ได้แก่ แอมโมเนียม ไนโตรเจน ฟอสเฟต กลูโคส ออโตไลสียีสต์ (Autolysed yeast) วิตามิน และเกลือของกรดอินทรีย์บางชนิด (Conner และ Allqeier, 1976) น้ำส้มสายชูกลั่นอาจได้จากการนำน้ำส้มสายชูที่หมักจากสุราขาวเจือจางหรือเอธานอลเจือจางตามวิธีที่กล่าวข้างต้นมากลั่นอีกครั้ง หรืออาจได้จากการนำน้ำส้มสายชูหมักมากลั่นอีกครั้ง น้ำส้มสายชูกลั่นมีลักษณะใส ไม่มีสี แต่ขาดกลิ่นรสบางอย่างที่พบในน้ำส้มสายชูหมัก

4.1.1.3 น้ำส้มสายชูเทียม (Non-brewed vinegar) เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำเอากรดอะซิติกเข้มข้นมาเจือจางให้มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 4 กรัมแต่ไม่เกิน 7 กรัมต่อ 100 มล. ที่อุณหภูมิ 27 °ซ. จัดเป็นน้ำส้มสายชูที่ราคาถูกแต่ขาดกลิ่นรสที่ดี

4.1.2 องค์ประกอบและคุณภาพของน้ำส้มสายชู (เผดิจ วัชรโกมลพันธ์, 2540)

องค์ประกอบของน้ำส้มสายชูที่ได้จากกระบวนการหมักได้แก่ น้ำ กรดอะซิติก และสารอื่นๆ เล็กน้อย กรดอะซิติกทำให้น้ำส้มสายชูมีรสเปรี้ยว มีคุณสมบัติป้องกันการเน่าเสีย และเป็นตัวทำละลายที่ดี สารอื่นๆในน้ำส้มสายชูนั้นมีความสำคัญในด้านกลิ่นรสทำให้น้ำส้มสายชูมีกลิ่นรสดีกว่าน้ำส้มสายชูเทียม สารเหล่านี้มีปริมาณเพียงเล็กน้อย โดยอาจมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู

รวมทั้งสารที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาเช่น เอธานอลทำปฏิกิริยากับกรดอะซิติกเป็นเอทธิลอะซิเตท (Ethyl acetate) ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสในน้ำส้มสายชู ในน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักตามธรรมชาติ จะพบสารระเหย 4 ชนิดได้แก่ อะเซตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) อะเซตัล (Acetal) เอทธิลอะซิเตท (Ethyl acetate) และเอธานอล นอกจากนี้ยังมีสารที่ทำให้กลิ่นรสของน้ำส้มสายชูดี คือ คาร์บอนิล (Carbonyl) แอลกอฮอล์ และเอสเทอร์ (Ester) (Conner และ Allqeier, 1976)

ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเรื่องน้ำส้มสายชู มอก. 83-2627 กำหนดมาตรฐานน้ำส้มสายชูดังนี้ (เผด็จ วัชรโกมลพันธ์, 2540)

4.1.2.1 ลักษณะทั่วไปเมื่อตรวจพินิจ (น้ำส้มสายชูหมัก)

- มีสีตามธรรมชาติของวัตถุ
- มีกลิ่นของกรดอะซิติกและอาจมีกลิ่นวัตถุดิบที่ใช้หมักอยู่ด้วยก็ได้
- ใส ไม่มีหนอนน้ำส้ม สิ่งสกปรก หรือสิ่งเจือปนอื่นใด
- ไม่มีตะกอนนอกจากตะกอนโดยธรรมชาติของน้ำส้มสายชูหมัก

4.1.2.2 ลักษณะทั่วไปเมื่อตรวจพินิจ (น้ำส้มสายชูกลั่น)

- มีสีตามธรรมชาติของวัตถุที่ใช้ซึ่งผ่านกรรมวิธีการผลิต
- มีกลิ่นของกรดอะซิติกและอาจมีกลิ่นวัตถุดิบที่ใช้หมักอยู่ด้วยก็ได้
- ใส ไม่มีสิ่งสกปรก หรือสิ่งเจือปนอื่นใด
- ไม่มีตะกอน

4.1.2.3 ลักษณะทางเคมี แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำส้มสายชูตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 83-2627

รายการที่	องค์ประกอบ	เกณฑ์ที่กำหนด	
		น้ำส้มสายชูหมัก	น้ำส้มสายชูกลั่น
1	กรดอะซิติก กรัมต่อ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไม่น้อยกว่า	4	4
2	ของแข็งทั้งหมด (Total solid) ร้อยละ	ไม่น้อยกว่า 1	ไม่น้อยกว่า 1
3	กรดแร่อิสระ (Free mineral acid)	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ
4	เมธานอล	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ

ที่มา : เผด็จ วัชรโกมลพันธ์, 2540.

4.1.3 วิธีการผลิตน้ำส้มสายชูในทางอุตสาหกรรม

วิธีการผลิตน้ำส้มสายชูแบ่งเป็น 3 วิธี คือ

4.1.3.1 วิธีผลิตน้ำส้มสายชูแบบช้า (Slow process) หรือ Surface culture

วิธีผลิตน้ำส้มสายชูแบบนี้เป็นวิธีที่มีมาแต่ดั้งเดิม โดยการตั้งไวน์ทิ้งไว้ในภาชนะเปิดแล้วปล่อยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดอะซิติกเองตามธรรมชาติ เชื้อน้ำส้มสายชูจะเจริญเป็นแผ่นฝ้าที่ผิวหน้าของไวน์ กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูจึงเป็นแบบ batch ซึ่งจำเป็นต้องมีการสร้างแผ่นฝ้าขึ้นใหม่ทุกครั้ง กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นช้าและมีประสิทธิภาพต่ำ (Asai, 1968) ต่อมาได้มีการปรับปรุงกระบวนการเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นโดยใช้เชื้อน้ำส้มสายชูบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพดี การผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำตาลสดในประเทศฟิลิปปินส์นั้นใช้เชื้อที่ติดอยู่ภายในถังหมักและในน้ำส้มสายชูที่เหลืออยู่ในถังหมักเดิมเป็นกล้าเชื้อ (Inoculum) การหมักน้ำส้มสายชูด้วยวิธีนี้มักไม่สมบูรณ์ เพราะพบว่ามีเอธานอลเหลืออยู่ในน้ำส้มสายชูที่ได้ (Gibbs และ Shapton, 1968) ต่อมาได้มีการปรับปรุงวิธีการผลิต น้ำส้มสายชูโดยวิธีกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous) เพื่อลดระยะเวลาและการสูญเสียซับสเตรทเนื่องจากการสร้างแผ่นฝ้าใหม่ของเชื้อ เรียกการหมักวิธีนี้ว่า Orleans process โดยใช้ถังไม้ขนาด 50-100 แกลลอน วางในแนวนอน มีช่องเล็กๆ อยู่ส่วนบนซึ่งมักปิดด้วยผ้าฝ้ายเพื่อกันแมลงมิให้เข้าไปข้างในแต่อากาศสามารถผ่านได้ดี ส่วนบนของถังไม้มีท่อต่อไว้สำหรับเติมไวน์ลงสู่ก้นถังเพื่อไม่ให้ไปรบกวนแผ่นฝ้าภายในถัง บรรจุหัวเชื้อน้ำส้มสายชูในปริมาณหนึ่งในสามส่วนของถังหมักแล้วเติมสารละลายแอลกอฮอล์หรือไวน์ลงไป เมื่อการหมักดำเนินไปจนได้ปริมาณกรดตามต้องการแล้ว จึงดูดน้ำส้มสายชูออกสองในสามส่วน แล้วเติมสารละลายแอลกอฮอล์ใหม่ลงไปอีก ถังหมักจะต้องทำความสะอาดทุกๆ 6-8 ปี (Casida, 1968)

ในประเทศญี่ปุ่นมีการผลิตน้ำส้มสายชูโดยใช้วิธีหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous) โดยให้สารละลายแอลกอฮอล์ไหลผ่านลงถาดตื้นๆ ที่วางเรียงกันทีละถาดในอัตราคงที่โดยให้รบกวนแผ่นฝ้าน้อยที่สุด พบว่าอัตราการผลิตน้ำส้มสายชูจะสูงกว่าวิธีผลิตแบบเร็ว (Quick process) แต่ต่ำกว่าวิธีผลิตแบบซับเมอร์จ (Submerged process) การผลิตน้ำส้มสายชูแบบช้าหรือการใช้เชื้อเจริญที่ผิวหน้านี้จะใช้เวลาการผลิตนานกว่าวิธีอื่นๆ ถังหมักแบบ Orleans process 1 ถังจะผลิตน้ำส้มสายชูได้เพียงครึ่งถังต่อเดือน แต่เป็นวิธีการที่ง่ายและใช้อุปกรณ์ราคาถูก ไม่ต้องมีระบบหล่อเย็น (Cooling system) เพราะกระบวนการเกิดกรดช้า ใช้พลังงานน้อย แต่ต้องใช้เนื้อที่และแรงงานมาก ดังนั้นในประเทศที่กำลังพัฒนาที่มีค่าแรงงานและราคาที่ดินต่ำจึงยังคงใช้วิธีนี้อยู่ (Adams, 1985)

4.1.3.2 วิธีผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็ว (Quick process)

วิธีผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็ว มีอัตราการเกิดน้ำส้มสายชูสูงกว่าวิธีผลิตน้ำส้มสายชูแบบช้า เนื่องจากมีการปรับปรุงให้มีพื้นที่ผิวหน้าของแผ่นฝ้าเชื้อน้ำส้มสายชูและระบบการให้อากาศมากขึ้น ภายในถังหมักบรรจุวัสดุตัวกลาง (Packing) ให้เชื้อเกาะวัสดุตัวกลางมักนิยมใช้พวกเซลลูโลส (Cellulose) เช่น เปลือกไม้ ก้านองุ่น หวาย ซังข้าวโพด ชานอ้อย การผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็วมักใช้ระบบกึ่งต่อเนื่องจึงต้องเติมเอธานอลปริมาณเล็กน้อยในน้ำส้มสายชูที่ได้เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยา Overoxidation ที่เกิดจากเชื้อน้ำส้มสายชูออกซิไดส์กรดอะซิติกที่เกิดขึ้นจนได้น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้สูญเสียกรดอะซิติกไป การมีเอธานอลปริมาณเล็กน้อยในน้ำส้มสายชูยังทำให้กลิ่นของน้ำส้มสายชูดีขึ้นด้วย เนื่องจากเอธานอลจะถูกเปลี่ยนเป็นเอสเทอร์ในระหว่างการเก็บ น้ำส้มสายชูที่ได้จากการผลิตแบบเร็วจะมีคุณภาพดีและใสเนื่องจากมีการกรองอยู่ในตัว (Allgeier และ Hildebrandt, 1960)

4.1.3.3 การผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมอร์จ (Submerged culture)

การผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมอร์จไม่จำเป็นต้องใช้วัสดุตัวกลางเพื่อให้เชื้อน้ำส้มสายชูเกาะ โดยเชื้อจะอยู่ในสารละลายแอลกอฮอล์โดยตรง มีการให้อากาศหรือออกซิเจนเข้าไปในลักษณะของฟองอากาศ มีเครื่องปั่นกวนให้เชื้อน้ำส้มสายชูและฟองอากาศกระจายไปทั่วถังหมัก การหมักวิธีนี้จึงจำเป็นต้องมีระบบการให้อากาศที่มีประสิทธิภาพดีและสม่ำเสมอ (Hromatka และ Ebner, 1959) ถังหมักที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมอร์จมีหลายแบบ คือ

- ถังหมักแบบอะซิเดเตอร์ (Acetator)

ผลิตโดยบริษัท Heinrich Frings ประเทศเยอรมันนี ถังหมักทำด้วย สแตนเลส ขนาดตั้งแต่ 750-12,000 ลิตร มีระบบการให้อากาศที่มีประสิทธิภาพสูงมีเครื่องกวนของเหลว (Agitator) อยู่บริเวณก้นถังตลอดจนมีระบบหล่อเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิของถังหมักซึ่งให้มีค่าประมาณ 30 °ซ. การผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมอร์จ มักมีปัญหาการเกิดฟอง ซึ่งจะทำให้สูญเสียของเหลวและทำให้อัตราการละลายของออกซิเจนลดลงด้วย อาจแก้ไขได้โดยใช้สารกำจัดฟองบางชนิด เช่น ซิลิโคนหรือใช้เครื่องกำจัดฟอง (Adam, 1985) ทำลายฟองให้แตกเป็นของเหลวและแก๊ส

- ถังหมักแบบ Yeoman's Cavitator

ผลิตโดยบริษัท Yeoman Brothers ประเทศสหรัฐอเมริกา ลักษณะส่วนใหญ่คล้ายอะซิเดเตอร์ แต่ต่างกันที่ระบบให้อากาศ โดยของเหลวและอากาศจะถูกดูดลงมาทางท่อจากด้านบนสู่ส่วนกลางของถังอย่างต่อเนื่อง มีใบพัดกวนให้ของเหลวผสมกับอากาศอย่างทั่วถึงแล้วของเหลวจะไหลย้อนขึ้นไปเพื่อ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระจายทั่วถังหมัก ถังหมักชนิดนี้ไม่นิยมใช้กันแพร่หลาย แต่ยังคงมีใช้บ้างในประเทศสหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น (Nickol, 1976)

- ถังหมักแบบ Tower

ใช้ผลิตน้ำส้มสายชูในประเทศอังกฤษ การหมักเป็นแบบระบบต่อเนื่อง ถังหมักมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ฟุต สูง 20 ฟุต ภายในมีแผ่นพลาสติกเจาะรูหลายแผ่นวางคั่นตามแนวขวางของตัวถัง ใช้ผลิตน้ำส้มสายชูได้ทุกชนิดถังหมักชนิดนี้ให้ผลผลิตเท่ากับ อะซิเตเตอร์ แต่ราคาถูกกว่าครึ่งหนึ่งแต่ในระดับอุตสาหกรรมยังไม่นิยมกันมากนัก (Conner และ Allqeier, 1976)

- ถังหมักแบบ Vinegator

ผลิตโดยบริษัท Swiss Company Chemap มีทั้งเครื่องกวนอากาศ และเครื่องอัดอากาศที่ควบคุมด้วย Polargraphic oxygen electrode ซึ่งจะทำงานเมื่อปริมาณออกซิเจนในสารละลายลดต่ำกว่าที่กำหนดจึงเป็นวิธีการใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง (Conner and Allqeier, 1976)

4.1.4 เชื้อจุลินทรีย์และปัจจัยสำคัญในการหมักกรดอะซิติก

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้หมักในการผลิตน้ำส้มสายชูได้ผ่านการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีเพื่อให้ปริมาณกรดอะซิติกสูง ใช้เวลาในการหมักน้อยลง และแข็งแรงทนทาน ตัวอย่างสายพันธุ์ที่ใช้เช่น บริษัท Frings ได้ใช้เชื้อสายพันธุ์ *Acetobacter pasteurianus* F1-F5 ซึ่งให้คุณสมบัติดีในการผลิตน้ำส้มสายชู ส่วนปัจจัยที่สำคัญในการหมักกรดอะซิติก (เผด็จ วัชรโกมลพันธ์, 2540) คือ

- เชื้อแบคทีเรีย มักใช้สกุล *Acetobacter* ที่ผ่านการคัดเลือกสำหรับใช้การผลิตน้ำส้มสายชูมาแล้ว
- อาหาร แอลกอฮอล์ที่ใช้นิยมใช้เป็นชนิดเข้มข้นนำมาทำให้เจือจางหรืออาจใช้แอลกอฮอล์ที่ได้จากธัญพืช ผลไม้ และน้ำผึ้ง
- แร่ธาตุที่จำเป็น อะซิติกแอซิดแบคทีเรียต้องการแร่ธาตุในการเจริญเติบโต เช่นไนโตรเจน ฟอสเฟต และโปแตสเซียม
- น้ำ ควรเป็นน้ำที่มีสารละลายต่ำและไม่มีความกระด้าง
- อากาศ ออกซิเจนเป็นส่วนที่ทำให้อะซิติกแอซิดแบคทีเรียดำรงชีพและเจริญเติบโตได้ ถ้าอากาศที่ใส่ในถังหมักน้อยไปจะทำให้การเจริญเติบโตไม่ดี แต่ถ้ามากเกินไปจะทำให้เกิดการสูญเสียของแอกอฮอล์และน้ำส้มสายชูที่เกิดขึ้นจากการระเหยออกไปทางท่อระบายอากาศ

- อุณหภูมิในการหมักเมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตจะมีความร้อนเกิดขึ้นและจะสะสมมากขึ้นถ้าไม่มีการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสม แบคทีเรียก็จะหยุดการเจริญเติบโตและตายได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักที่เหมาะสมคือ 29-30 °ซ.

4.1.5 การเตรียมวัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูในถังหมักแบบอะซิเตเตอร์ จะต้องอยู่ในรูปที่เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์เรียบร้อยแล้ว ดังนั้นถ้าใช้วัตถุดิบชนิดอื่นมาผลิตน้ำส้มสายชูจะต้องผ่านกรรมวิธีเปลี่ยนแป้งหรือน้ำตาลให้อยู่ในรูปแอลกอฮอล์เสียก่อน ถ้าเป็นวัตถุดิบพวกธัญพืชจำเป็นต้องอาศัยเชื้อราในสกุล *Aspergillus* และยีสต์สกุล *Saccharomyces* ช่วงในการหมักเพื่อทำให้เกิดแอลกอฮอล์ (เผด็จ วัชรโกมลพันธ์, 2540)

4.1.6 อุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชูในประเทศไทย
(เผด็จ วัชรโกมลพันธ์, 2540)

4.1.6.1 สถานภาพของอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชูในประเทศไทย

ในอดีตเราต้องสั่งซื้อน้ำส้มสายชูจากต่างประเทศในรูปของน้ำส้มสายชูหรือกรดอะซิติกเข้มข้น เมื่อมีการบริโภคมากขึ้นจึงมีผู้ผลิตน้ำส้มสายชูขึ้นในประเทศ โดยเป็นการผลิตแบบโบราณดั้งเดิมเป็นอุตสาหกรรมภายในครัวเรือนซึ่งไม่เพียงพอต่อการบริโภค ดังนั้นเมื่อประมาณ 30-40 ปีที่ผ่านมานี้จึงมีการทำเครื่องจักรสำหรับผลิตน้ำส้มสายชูกลั่นเข้ามาผลิตแบบอุตสาหกรรมอย่างจริงจัง ปัจจุบันน้ำส้มสายชูที่ผลิตได้ในประเทศไทยมีประมาณ 20,000-25,000 ตันต่อปี คิดที่ความเข้มข้น 5%

4.1.6.2 แนวโน้มความต้องการของผู้บริโภค

คนไทยรู้จักบริโภคน้ำส้มสายชูในการปรุงอาหารให้มีรสเปรี้ยว นอกจากนี้ยังใช้ถนอมอาหารทำให้เก็บรักษาได้ยาวนานขึ้น ปัจจุบันอุตสาหกรรมได้ใช้น้ำส้มสายชูเพื่อแปรรูปวัตถุดิบ หรือใช้เป็นส่วนผสมของอาหารต่างๆ และได้เริ่มหันมาใช้น้ำส้มสายชูเพื่อผลิตสินค้าอื่นๆ ด้วย

4.1.6.3 แนวทางการพัฒนาการผลิตในอนาคต

การพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรีย มีผลต่อการผลิตน้ำส้มสายชูมาก หากสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดอะซิติกได้ก็จะช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้มากขึ้นทำให้การแข่งขันตลาดเป็นไปได้สูงในขณะนี้ราคาน้ำส้มสายชูของประเทศไทยสูงกว่าประเทศอื่นพอสมควร

4.2 การผลิตเซลลูโลส

การใช้ประโยชน์ของเซลลูโลสจากเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียมีด้วยกัน 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ เพื่อการบริโภค เช่น Nata de coco ซึ่งควรจะมีเนื้อสัมผัสที่ดีเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งคำว่า Nata de coco ที่ใช้เรียกชื่อวุ้นน้ำมะพร้าวนั้น เป็นคำในภาษาสเปน หมายถึง แผ่นเซลลูโลสหนาสีขาวหรือสีครีมมาจากมะพร้าว นอกจากจะใช้บริโภคแล้วประโยชน์อีกด้านหนึ่งก็เพื่อใช้ในทางอุตสาหกรรมผลิตเซลลูโลส เช่นการทำเยื่อกระดาษเป็นต้น เซลลูโลสจากจุลินทรีย์มีข้อดีด้วยกันหลายประการ เช่น มีความบริสุทธิ์สูง และยังช่วยลดการใช้ไม้ลงเป็นการช่วยลดมลพิษทางอ้อมจากปริมาณน้ำเสียที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการทำเยื่อกระดาษ มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสและโพลีแซคคาไรด์ คือ

Jesus และคณะ (1971) ได้ศึกษาการแยกเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้จากผัก ผลไม้ และน้ำส้มสายชู และพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น "*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*"

Colvin และคณะ (1977) ได้พบสารโพลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้จากสายพันธุ์ "*Acetobacter xylinum*" ซึ่งประกอบด้วยสายกลูโคสเป็นเส้นตรงและมีกิ่งที่ต่อด้วยพันธะ β-1→4 ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของกลูโคสสายตรงทุกๆ สาย

Valla และ Kjosbakken (1981) ได้พบ "*Acetobacter xylinum*" สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเฮ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดใหม่ ซึ่งโครงสร้างที่ประกอบด้วย กลูโคส:แมนโนส:แรมโนส:กรดกลูโคนิก ในอัตราส่วน 3:1:1:1 โดยประมาณ

Minakami และคณะ (1984) ได้พบอะซิติก แอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างโพลีแซคคาไรด์ชนิดใหม่ซึ่งแยกได้จากกากน้ำส้มสายชูพบว่าเป็นสกุล *Acetobacter* โพลีแซคคาไรด์ที่ได้ประกอบด้วย กลูโคส : กาแลคโตส : แมนโนส : กรดกลูคูโรนิค (Glucuronic acid) ในอัตราส่วน 6:2:1:1 โดยปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโพลีแซคคาไรด์นั้นขึ้นอยู่กับน้ำตาลที่ใช้เลี้ยงเชื้อด้วย

Gossele และ Swings (1985) ได้พิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อบางสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้พบว่าเป็นเชื้อ "*Acetobacter hansenii*"

Ammemura และคณะ (1985) พบการสร้างกลูแคน (Glucan) ปริมาณ 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*" โพลีแซคคาไรด์ประกอบด้วย กลูโคส : แรมโนส : แมนโนส : กรดกลูคูโรนิค ในอัตราส่วน 6:1:1:1

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*" และพบว่าพื้นผิวที่สัมผัสกับอากาศมีผลต่อการผลิตเซลลูโลส ซึ่งถ้ายิ่งมีพื้นที่ผิวมากก็จะทำให้การผลิตเซลลูโลสเป็นไปได้มาก

Toyasaki และคณะ (1995) ได้ทำการแยกเชื้อจากผลไม้ชนิดต่างๆเพื่อหาสายพันธุ์ที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงในภาวะเขย่าพบสายพันธุ์ BPR 2001 ซึ่งยังไม่ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงถึง 7.7 กรัมต่อลิตร ใน Jar fermenter

4.2.1 ชนิดของเซลลูโลสที่เชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียสร้างได้

4.2.1.1 เซลลูโลสชนิดแข็ง (Hard cellulose)

สร้างโดย *Gluconoacetobacter xylinus* (*Acetobacter xylinum*) จากซับสเตรทพวกเฮกโซส (Hexose) คือ กลูโคส ฟรุคโตส และกาแลคโตส พบว่าการเติมเอทานอลเล็กน้อยจะช่วยในการสร้างเซลลูโลสได้ดีขึ้น เมื่อวิเคราะห์หาความชื้นของชั้นเซลลูโลสที่ผลิตได้พบว่ามีน้ำเป็นส่วนประกอบประมาณ 95% ส่วนที่เหลือเป็นเซลลูโลส

4.2.1.2 เซลลูโลสชนิดอ่อน (Soft cellulose)

เซลลูโลสชนิดนี้ประกอบด้วย กลูโคสประมาณ 600 หน่วย ซึ่งเชื่อมกันด้วย β-glycosidic linkage ลักษณะคล้ายกับเซลลูโลสในฝ้าย โดยเชื้อจะใช้แหล่งคาร์บอนจาก เอธิลลีน ไกลคอล (Ethylene glycol) กลีเซอรอล (Glycerol) แมนนิทอล (Mannitol) อะราบิโนส (Arabinose) ไซโลส (Xylose) ฟรุคโตส (Fructose) กาแลคโตส (Galactose) ซูโครส (Sucrose) แลคโตส (Lactose) ในการสร้างเซลลูโลส (สมบูรณ์ ชนาศุภวัฒน์, 2526)

4.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเซลลูโลส

(โชคชัย กิตติเกิดคุณ และเกรียงไกร พิทักษ์ตระกูลศิริ, 2538)

พบว่าการที่จะผลิตวุ้นมะพร้าวให้ได้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี คือ เนื้อนุ่มเหนียวพอเหมาะไม่เป็นเส้นใยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

- ปริมาณเชื้อเริ่มต้น *Gluconoacetobacter xylinus* ควรอยู่ในช่วง 10-20% ของอาหารจะทำให้ได้ผลผลิตมากที่สุด

- อายุของน้ำมะพร้าว ควรใช้น้ำมะพร้าวแก่ที่สดและใหม่ ซึ่งหาได้ง่าย

-ปริมาณอากาศ ภาชนะที่ใช้ในการหมักควรมีพื้นที่ผิวกว้างเพราะเชื้อต้องการอากาศในการเจริญเติบโตและเชื้อจะสร้างแผ่นเซลลูโลสเฉพาะผิวหน้าของอาหารเท่านั้น

-ความนิ่งในการหมัก ดังนั้นในระหว่างการหมักต้องระวังไม่ให้มีการกระทบกระเทือน เพราะจะทำให้แผ่นเซลลูโลสจม ซึ่งถ้าจมแล้วจะมีการสร้างชั้นเซลลูโลสขึ้นมาใหม่ในอัตราที่ช้าลง

-ความเป็นกรดเป็นด่างและอุณหภูมิ การสร้างเซลลูโลสจะเกิดดีที่สุดในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 4.0-6.0 และที่อุณหภูมิ 21-38 °ซ.

-แหล่งคาร์บอน น้ำตาลกลูโคสจะให้ความหนาของเซลลูโลสมากที่สุด รองลงมาคือซูโครสซึ่งหาได้ง่ายและมีราคาถูกกว่ากลูโคส จึงเหมาะที่จะใช้เป็นน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ในปริมาณ 5-8%

-แหล่งไนโตรเจน โดยจะช่วยเร่งการผลิตเซลลูโลสให้ได้ความหนาในเวลาสั้น สารที่ใช้คือแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตหรือแอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้ในปริมาณ 0.5-0.6%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย