

ภาวะที่มีผลต่อการแปรผันด้วยตัวเองของเชื้อ *Acetobacter xylinum*



นางสาวนริศรา กิตติวณิชานนท์

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0192-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONDITIONS THAT EFFECT SPONTANEOUS VARIATION OF *Acetobacter xylinum*



Miss Narissara Kittivanichanon

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0192-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ภาวะที่มีผลต่อการแปรผันด้วยตัวเองของเชื้อ <i>Acetobacter xylinum</i>
โดย	นางสาวนริศรา กิตติวณิชานนท์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....รองคณบดีฝ่ายบริหาร  
(รองศาสตราจารย์ ดร. พิพัฒน์ การเที่ยง รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยุทธ ธีรพิทยากุล)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พาสวดี ประทีปะเสน)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)

นริศรา กิตติวณิชานนท์ : ภาวะที่มีผลต่อการแปรผันด้วยตัวเองของเชื้อ *Acetobacter xylinum*  
(CONDITIONS THAT EFFECT SPONTANEOUS VARIATION OF *Acetobacter xylinum*)

อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุเมธ ตันตระเจียร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ ; 124 หน้า.

ISBN 974-17-0192-6

เชื้อ *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มีลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและการสร้างวุ้นแตกต่างกัน โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดเป็น 9°Brix ด้วยน้ำตาลซูโครสและปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 5 ด้วยกรด อะซิติก ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน พบว่า สายพันธุ์ TISTR 893 สร้างวุ้นที่มีความหนา 0.36 เซนติเมตร มีน้ำหนักเปียก 9.78 กรัม ปริมาณกรดในอาหารเป็น 0.22% (w/v) ผลิตเซลลูโลส 35.27% (กรัมเซลลูโลสต่อปริมาณ น้ำตาลที่ใช้ 100 กรัม) TISTR 975 สร้างวุ้นที่มีความหนา 1.04 เซนติเมตร มีน้ำหนักเปียก 27.73 กรัม ปริมาณกรด ในอาหารเป็น 0.30% ผลิตเซลลูโลส 27.88% และ TISTR 1037 สร้างวุ้นที่มีความหนา 0.55 เซนติเมตร มีน้ำหนัก เปียก 14.56 กรัม ปริมาณกรดในอาหารเป็น 0.23% ผลิตเซลลูโลส 30.10% เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อ 3 วิธีคือ เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ภาวะนิ่งต่อเชื้อทุกๆ 3 วัน เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm ต่อเชื้อทุกๆ 3 วัน และเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็งที่ภาวะนิ่งต่อเชื้อทุกๆ 7 วัน ทำให้พบเชื้อแปรผัน 4 สายพันธุ์ที่มีลักษณะโคโลนีเปลี่ยนไปจากลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์เดิมดังนี้ 893A แปรจาก TISTR 893 หลังจาก เลี้ยงในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็งที่ภาวะนิ่งและต่อเชื้อเป็นจำนวน 10 ครั้ง สร้างวุ้นที่มีความหนา 0.38 เซนติเมตรและผลิตเซลลูโลสลดลงเป็น 12.97% 975A แปรจาก TISTR 975 หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะ เขย่าและต่อเชื้อเป็นจำนวน 16 ครั้ง สร้างวุ้นที่มีความหนา 0.63 เซนติเมตรและผลิตเซลลูโลสลดลงเป็น 13.02% 975B แปรจาก TISTR 975 หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะนิ่งและต่อเชื้อเป็นจำนวน 16 ครั้ง สร้างวุ้นที่มีความ หนา 0.41 เซนติเมตรและผลิตเซลลูโลสลดลงเป็น 11.36% 1037A แปรจาก TISTR 1037 หลังจากเลี้ยงในอาหาร เหลวที่ภาวะเขย่าและต่อเชื้อเป็นจำนวน 16 ครั้ง สร้างวุ้นที่มีความหนา 0.64 เซนติเมตรและผลิตเซลลูโลสลดลงเป็น 16.51% ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อทั้ง 3 วิธีเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง จะนำเชื้อมาวัดการสร้างวุ้นเพื่อติดตาม การเปลี่ยนแปลงของเชื้อเปรียบเทียบกับลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง พบว่าถึงแม้เชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะ การสร้างวุ้นในทุกครั้งที่ทำการวัด แต่ลักษณะโคโลนีของเชื้อไม่ได้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปด้วยทุกครั้ง เมื่อทดสอบ ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแปรผันทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่ามีความแตกต่างกันและแตกต่างจากเชื้อตั้งต้น แต่เมื่อ ทดสอบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อตั้งต้น 3 สายพันธุ์และเชื้อแปรผัน 4 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 8 ชนิดพบว่า แถบดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์บน อะกาโรสเจลที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 8 ชนิดไม่มีความแตกต่างกัน

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิติ.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4172321523 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD : *Acetobacter* sp./ CELLULOSE/ RFLP

NARISSARA KITTIVANICHANON : CONDITIONS THAT EFFECT SPONTANEOUS VARIATION OF  
*Acetobacter xylinum*. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUMATE TANTRATIAN, Ph. D., THESIS  
CO-ADVISOR : ASST. PROF. VICHIEEN RIMPHANITCHAYAKIT, Ph. D. 124 pp.  
ISBN 974-17-0192-6

Three strains of *Acetobacter* sp. obtained from Thailand Institute of Scientific and Technological Research were different in morphology, chemical characteristics and cellulose production. After cultivation in coconut water media, which was adjusted the total soluble solid to 9°Brix by sucrose and pH to 5 by acetic acid at 30°C for 7 days, TISTR 893 produced 0.36 centimeters in pellicle thickness which had 9.78 grams wet weight, 0.22% acid content (as g acetic acid per 100 ml media) and 35.27% yield of cellulose, TISTR 975 produced 1.04 centimeters in pellicle thickness which had 27.73 grams wet weight, 0.30% acid content and 27.88% yield of cellulose and TISTR 1037 produced 0.55 centimeters in pellicle thickness which had 14.56 grams wet weight, 0.23% acid content and 30.10% yield of cellulose. Three methods of cultivation and subculture were culturing in liquid media under static condition and subculture every 3 days, culturing in liquid media at 150 rpm with shaking condition and subculture every 3 days, and alternately culturing in liquid media and agar media under static condition and subculture every 7 days. These resulted in 4 variants, which were different in colony forming from parent cultures. The 893A varied from TISTR 893 after alternately culturing in liquid media and agar media under static condition and subculture for 10 times, it produced 0.38 centimeters in pellicle thickness and 12.97% yield of cellulose. The 975A varied from TISTR 975 after culturing in liquid media at 150 rpm with shaking condition and subculture for 16 times, it produced 0.63 centimeters in pellicle thickness and 13.02% yield of cellulose. The 975B varied from TISTR 975 after culturing in liquid media under static condition and subculture for 16 times, it produced 0.41 centimeters in pellicle thickness and 11.36% yield of cellulose. The 1037A varied from TISTR 1037 after culturing in liquid media at 150 rpm with shaking condition and subculture for 16 times, it produced 0.64 centimeters in pellicle thickness and 16.51% yield of cellulose. During the cultivations of every 4 subcultures, there were detectable reductions of cellulose production but no variation in colony forming. Chemical characteristics of 4 variants were different from each other and from parent cultures. Genetic characteristics of the 3 TISTR strains and 4 variants were tested by using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) technique with 8 restriction enzymes and found that there were no differences.

Department of Food Technology

Field of study Food Technology

Academic year 2001

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ ด้วยความกรุณาเป็นอย่างสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร ริมพณิชกิจ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองที่ได้ให้โอกาสในการเรียนรู้ ให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น คำสอน ตลอดจนความเข้าใจและกำลังใจตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยุทธ ธีรพิทยากุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พาสวดี ประทีปะเสน และผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทัศนศักดิ์ สุขในศิลป์ ที่กรุณา เป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ เกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความกรุณาช่วยเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ด้วยวิธีไลโอไฟไลซ์

ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน ที่ให้ความสะดวกในการใช้ สถานที่และอุปกรณ์ในระหว่างการทำงานวิจัย

ขอบพระคุณป้าสำลี คงแสงชู ตลาดลาดพร้าวสะพานสอง ที่เอื้อเพื่อนำมะพร้าวสำหรับเป็น วัตถุดิบในงานวิจัย

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ห้องปฏิบัติการชั้น 7 ภาควิชาชีวเคมี สำหรับน้ำใจที่มีให้และ ความเอื้อเฟื้อด้านสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี ในการทำงานวิจัยด้านพันธุกรรม

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร สำหรับความช่วยเหลือและ กำลังใจที่มีให้กันตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ พ่อ แม่ และสมาชิกในครอบครัว สำหรับความรักและความเข้าใจ อันยิ่งใหญ่

นริศรา กิตติวิชานนท์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป.....	๗
บทที่	
1 <b>บทนำ</b> .....	1
2 <b>วารสารปริทัศน์</b>	
2.1 <i>Acetobacter xylinum</i> .....	3
2.2 การจำแนกชนิดของ <i>Acetobacter</i> .....	3
2.3 วุ้นมะพร้าว.....	4
2.4 เซลลูโลส.....	5
2.5 ชีวเคมีและลักษณะทางกายภาพของการผลิตเซลลูโลสโดย <i>Acetobacter xylinum</i> .....	8
2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อ <i>Acetobacter xylinum</i> .....	12
2.7 การใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>Acetobacter xylinum</i> .....	15
2.8 การแปรผันของ <i>Acetobacter xylinum</i> .....	17
2.9 การใช้เทคนิคเรสทริคชันแฟรกเมนต์เลงธ์พอลิเมอร์พีซีเอ็มในการศึกษาความแตกต่าง ทางพันธุกรรม.....	20
3 <b>การทดลอง</b>	
3.1 แบบที่เรียที่ใช้ในการทดลอง.....	29
3.2 วัตถุประสงค์.....	29
3.3 สารเคมีและอุปกรณ์.....	29
3.4 วิธีการทดลอง.....	33

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง	
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรมของ <i>Acetobacter</i> sp.....	38
4.2 ลักษณะทางชีวเคมีของ <i>Acetobacter</i> sp.....	40
4.3 ลักษณะการสร้างวุ้นเซลล์ulos ของ <i>Acetobacter</i> sp.....	41
4.4 ลักษณะการเจริญเติบโตของ <i>Acetobacter</i> sp. ในภาวะนิ่งและภาวะเขย่า.....	46
4.5 ผลจากการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อ.....	47
4.6 ลักษณะทางพันธุกรรมของ <i>Acetobacter</i> sp.....	74
5 วิจารณ์ผลการทดลอง	
5.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของ <i>Acetobacter</i> sp.....	80
5.2 ลักษณะทางชีวเคมีของ <i>Acetobacter</i> sp.....	81
5.3 ลักษณะการสร้างวุ้นเซลล์ulos ของ <i>Acetobacter</i> sp. ....	82
5.4 การเจริญเติบโตของ <i>Acetobacter</i> sp. ....	83
5.5 การเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อ.....	83
5.6 ลักษณะทางพันธุกรรมของ <i>Acetobacter</i> sp.....	89
6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอนแนะ.....	91
รายการอ้างอิง .....	93
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	98
ภาคผนวก ข.....	103
ภาคผนวก ค.....	105
ภาคผนวก ง.....	109
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	124



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	องค์ประกอบของวุ้นมะพร้าวที่ได้จากเชื้อ <i>Acetobacter xylinum</i> .....5
4.1	ผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของ <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์.....40
4.2	ลักษณะการสร้างวุ้นของ <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....41
4.3	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะที่ทำการวัดจากการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C ที่ภาวะนิ่งและภาวะเขย่าของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์.....62
4.4	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะการสร้างวุ้น วัดหลังจากการต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงใน 3 ภาวะของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์โดยเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....63
4.5	ผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของ <i>Acetobacter</i> sp. 7 สายพันธุ์.....67
4.6	เปรียบเทียบการสร้างวุ้นระหว่าง <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 893 กับ 893A เมื่อเลี้ยงใน อาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....68
4.7	เปรียบเทียบการสร้างวุ้นระหว่าง <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 975 975A และ 975B เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....69
4.8	เปรียบเทียบการสร้างวุ้นระหว่าง <i>Acetobacter</i> sp. TISTR 1037 กับ 1037A เมื่อเลี้ยงใน อาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....70
ง.1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาวุ้น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่าง ของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และการผลิตเซลลูโลสโดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 893 TISTR 975 และ TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....109
ง.2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหารและปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 893 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงในภาวะนิ่ง.....110

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง.3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหารและปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 975 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงในภาชนะนี้.....110
ง.4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหารและปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงในภาชนะนี้.....111
ง.5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาวุ้น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และการผลิตเซลลูโลสโดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 893 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำกรเลี้ยง ในอาหารเหลวที่ภาชนะนี้.....111
ง.6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาวุ้น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และการผลิตเซลลูโลสโดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 975 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำกรเลี้ยง ในอาหารเหลวที่ภาชนะนี้.....112
ง.7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาวุ้น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และการผลิตเซลลูโลสโดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำกรเลี้ยง ในอาหารเหลวที่ภาชนะนี้.....113

### สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหารและปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 893 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงในภาวะเขย่า.....	113
ง.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหารและปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 975 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงในภาวะเขย่า.....	114
ง.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหารและปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงในภาวะเขย่า.....	114
ง.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหน่วง น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และการผลิตเซลล์โดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 893 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า.....	115
ง.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหน่วง น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และการผลิตเซลล์โดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 975 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า.....	116

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหน่วง น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่าง ของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลล์โลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และการผลิตเซลล์โลสโดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า.....	117
ง.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหน่วง น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่าง ของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลล์โลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และการผลิตเซลล์โลสโดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 893 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง.....	118
ง.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหน่วง น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่าง ของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลล์โลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และการผลิตเซลล์โลสโดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 975 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง.....	119
ง.16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหน่วง น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่าง ของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลล์โลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และการผลิตเซลล์โลสโดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง.....	120
ง.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหน่วง น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่าง ของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลล์โลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และการผลิตเซลล์โลสโดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 893 และ 893A เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	121

### สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง.18	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาก้อน น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่าง ของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และการผลิตเซลล์โดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 975 975A และ 975B เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....122
ง.19	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาก้อน น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่าง ของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ และการผลิตเซลล์โดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 1037 และ 1037A เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....123

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	พันธะ $\beta$ -1,4 กลูโคซิดิก.....	5
2.2	โครงสร้างของ cellulose I (A) ระบาย ab (ตามแนวของสายพอลิเมอร์); (B) ระบาย ac; (C) ร่างแหของพันธะไฮโดรเจนในระบาย ac.....	6
2.3	ภาพเส้นใยเซลลูโลสจากกล้อง scanning electron microscope A - เซลลูโลสจากแบคทีเรีย, B - เซลลูโลสจากพืช.....	7
2.4	เปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางของไฟเบอร์จาก bacterial cellulose กับไฟเบอร์สังเคราะห์ชนิดต่างๆ .....	7
2.5	เส้นทางการสังเคราะห์เซลลูโลสของ <i>Acetobacter xylinum</i> .....	8
2.6	โครงสร้างของ c-di-GMP.....	9
2.7	โมเดลระบบควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลสใน <i>Acetobacter xylinum</i> .....	10
2.8	โมเดลทั่วไปแสดงการจัดเรียงตัวของสายไฟเบอร์ใน <i>Acetobacter xylinum</i> .....	11
2.9	โครงสร้างที่ผิวกระดาษที่มีส่วนผสมของเซลลูโลสจากแบคทีเรียและ ผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนต.....	16
2.10	การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Acetobacter xylinum</i> ชนิดที่เป็น $Cel^+$ (wild type) และ $Cel^-$ ในภาวะการเลี้ยงแบบเขย่า.....	19
2.11	การตัดดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่งโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	21
2.12	พอลิเมอร์พื้ที่ตรวจพบได้จากการตัดดีเอ็นเอจากพืช V1 และ V2 ด้วยเอนไซม์ E แต่ไม่สามารถตรวจพบได้โดยใช้เอนไซม์ B.....	22
2.13	ก. ภาพแสดงส่วนประกอบต่างๆ ของเจลแชมเบอร์ ข. ภาพแสดงการประกอบแถบพลาสติก ค. ภาพแสดงการประกอบราวและหี.....	26
2.14	การเตรียมแชมเบอร์และการเพาะกาโรสเจลลงในแชมเบอร์.....	28
3.1	ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อ 3 วิธี.....	37
4.1	โคโลนีของ <i>Acetobacter</i> TISTR 893 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน .....	38
4.2	โคโลนีของ <i>Acetobacter</i> TISTR 975 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน .....	38

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.3 โคโลนีของ <i>Acetobacter</i> TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	39
4.4 ลักษณะเซลล์ของ <i>Acetobacter</i> sp. อายุ 7 วันเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า .....	39
4.5 น้ำหนักเปียกของวุ้นเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	42
4.6 ปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	43
4.7 ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียกของวุ้นเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	43
4.8 ปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	44
4.9 การผลิตเซลลูโลสโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	45
4.10 ลักษณะการเจริญเติบโตของ <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในภาชนะนิ่งและภาชนะย่ำที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 30°C .....	46
4.11 ค่า pH ของอาหารจากการเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงที่ภาชนะนิ่ง.....	47
4.12 ปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงที่ภาชนะนิ่ง.....	48
4.13 ปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงที่ภาชนะนิ่ง.....	48
4.14 ความหนาของวุ้นเซลลูโลสที่ผลิตโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาชนะนิ่ง.....	49

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.15	น้ำหนักเปียกของวุ้นเซลล์ูโลสที่ผลิตโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาชนะนี้.....49
4.16	ค่า pH ของอาหารจากการเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวที่ภาชนะนี้.....50
4.17	ปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวที่ภาชนะนี้.....50
4.18	ปริมาณเซลล์ูโลสต่อน้ำหนักเปียกของวุ้นเซลล์ูโลสที่ผลิตโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาชนะนี้.....51
4.19	ปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาชนะนี้.....51
4.20	การผลิตเซลล์ูโลสโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาชนะนี้.....52
4.21	ค่า pH ของอาหารจากการเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงที่ภาวะเขย่า.....53
4.22	ปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงที่ภาวะเขย่า.....53
4.23	ปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงที่ภาวะเขย่า.....54



## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.24	ความหนาของวุ้นเซลล์โลสที่ผลิตโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า.....54
4.25	น้ำหนักเปียกของวุ้นเซลล์โลสที่ผลิตโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า.....55
4.26	ค่า pH ของอาหารจากการเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า.....55
4.27	ปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า.....56
4.28	ปริมาณเซลล์โลสต่อน้ำหนักเปียกของวุ้นเซลล์โลสที่ผลิตโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า.....56
4.29	ปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า.....57
4.30	การผลิตเซลล์โลสโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า.....57
4.31	ความหนาของวุ้นเซลล์โลสที่ผลิตโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง.....58
4.32	น้ำหนักเปียกของวุ้นเซลล์โลสที่ผลิตโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง.....59

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.33	ค่า pH ของอาหารจากการเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวสลัดกับอาหารแข็ง.....59
4.34	ปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวสลัดกับอาหารแข็ง.....60
4.35	ปริมาณเซลล์โลสต่อน้ำหนักเปียกของวุ้นเซลล์โลสที่ผลิตโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวสลัดกับอาหารแข็ง.....60
4.36	ปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวสลัดกับอาหารแข็ง.....61
4.37	การผลิตเซลล์โลสโดย <i>Acetobacter</i> sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวสลัดกับอาหารแข็ง.....61
4.38	ลักษณะโคโลนีของ 893A เปรียบเทียบกับโคโลนีของ TISTR 893 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน..... 64
4.39	ลักษณะโคโลนีของ 975A และ 975B เปรียบเทียบกับโคโลนีของ TISTR 975 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน..... 65
4.40	ลักษณะโคโลนีของ 1037A เปรียบเทียบกับโคโลนีของ TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน..... 66
4.41	การเปรียบเทียบน้ำหนักเปียกของวุ้นที่ผลิตโดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ที่แปรผัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....71
4.42	การเปรียบเทียบปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ที่แปรผัน ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....71

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.43	การเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ลิวส์ต่อน้ำหนักเปียกของวุ้นที่ผลิตโดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ที่แปรผัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....72
4.44	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ที่แปรผัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....72
4.45	การเปรียบเทียบการผลิตเซลล์โดย <i>Acetobacter</i> sp. สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ที่แปรผัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....73
4.46	แถบดีเอ็นเอของ <i>Acetobacter</i> sp. 7 สายพันธุ์บนอะกาโรสเจล..... 74
4.47	แถบดีเอ็นเอของ <i>Acetobacter</i> sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI บนอะกาโรสเจล.....75
4.48	แถบดีเอ็นเอของ <i>Acetobacter</i> sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ <i>Eco</i> RI บนอะกาโรสเจล..... 75
4.49	แถบดีเอ็นเอของ <i>Acetobacter</i> sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ <i>Hind</i> III บนอะกาโรสเจล..... 76
4.50	แถบดีเอ็นเอของ <i>Acetobacter</i> sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ <i>Kpn</i> I บนอะกาโรสเจล..... 76
4.51	แถบดีเอ็นเอของ <i>Acetobacter</i> sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ <i>Nde</i> I บนอะกาโรสเจล..... 77
4.52	แถบดีเอ็นเอของ <i>Acetobacter</i> sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ <i>Pvu</i> II บนอะกาโรสเจล..... 77
4.53	แถบดีเอ็นเอของ <i>Acetobacter</i> sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ <i>Sa</i> I บนอะกาโรสเจล..... 78
4.54	แถบดีเอ็นเอของ <i>Acetobacter</i> sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ <i>Xba</i> I บนอะกาโรสเจล..... 78

# บทที่ 1

## บทนำ

*Acetobacter xylinum* เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม acetic acid bacteria คือ เชื้อที่สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ เชื้อบางชนิดในกลุ่มนี้ใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตน้ำส้มสายชู สำหรับ *Acetobacter xylinum* เป็นเชื้อที่นอกจากสามารถผลิตกรดอะซิติกแล้วยังสามารถผลิตวุ้นเซลลูโลสจากน้ำมะพร้าวได้อีกด้วย วุ้นเซลลูโลสที่ได้นี้นิยมบริโภคกันมานานในลักษณะเป็นของหวาน ชาวฟิลิปปินส์เรียกผลิตภัณฑ์นี้ว่า natto หรือ nata de coco หรือคนไทยเรียกว่า วุ้นมะพร้าว องค์ประกอบส่วนใหญ่ของวุ้นมะพร้าว คือ น้ำ และเส้นใยของเซลลูโลสซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่ประกอบขึ้นจากการจับตัวกันของกลูโคสหลายหน่วยด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 กลูโคซิดิก เซลลูโลสนี้ถูกเรียกว่า bacterial cellulose ซึ่งเส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรียนี้มีขนาดเล็กกว่าเส้นใยเซลลูโลสจากพืชประมาณ 10-1,000 เท่า (Yoshinaga, Tonouchi, and Watanabe, 1997)

นอกจากประโยชน์ในแง่ของการบริโภคแล้ว เซลลูโลสจากแบคทีเรียยังได้รับความสนใจในระดับอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีศักยภาพของความเป็นสารไบโอพอลิเมอร์ (biopolymer) ที่สามารถประยุกต์ใช้งานเฉพาะทางได้ในหลายลักษณะ เช่น ใช้เป็นสารให้ความข้นหนืด (thickener) และสารให้ความคงตัว (stabilizer) ในอุตสาหกรรมอาหาร ยาและเครื่องสำอาง ใช้ทำเป็นผิวหนังเทียม (artificial skin) เนื่องจากแผ่นวุ้นมีความแข็งแรงสูงเมื่อเปียกน้ำ ยอมให้อากาศและน้ำผ่านได้ ใช้เป็นส่วนประกอบในการทำกระดาษลำโพง (acoustic transducer diaphragm) ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ เป็นต้น (Valla, 1995)

*Acetobacter xylinum* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดเพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเซลลูโลส เช่น น้ำตาลเฮกโซส สารประกอบคาร์บอน 3 ตัว และ 4 ตัว แต่ไม่ว่าจะใช้แหล่งคาร์บอนต่างกันอย่างไร ก็จะต้องถูกเปลี่ยนให้เป็นสารตัวกลาง (intermediate) เริ่มต้น คือ กลูโคส-6-ฟอสเฟต (G6P) ก่อน ซึ่งสุดท้ายจะถูกเปลี่ยนเป็นยูริดีนไดฟอสโฟกลูโคส (UDP-glucose) ก่อนเข้าสู่หน่วยการสร้างเซลลูโลส (Tonouchi et al., 1996) สายพอลิกลูโคแซน (polyglucosan) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเส้นใยเซลลูโลสจะออกมาทางรูที่เรียกว่า extrusion pore ที่บริเวณผิวของเซลล์ *Acetobacter xylinum* ซึ่งมีอยู่ประมาณ 50-80 แห่ง สายพอลิกลูโคแซนที่ได้จะเกิดการพันตัวกันเป็นเส้นใยเซลลูโลสและขยายยาวต่อไปเรื่อยๆ โดยจะติดอยู่กับเซลล์แม้กระทั่งเมื่อเซลล์เกิดการแบ่งตัว (Valla, 1995)

ถ้าทำการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* ในภาชนะหนึ่ง จะได้วุ้นที่มีลักษณะเป็นแผ่นลอยตัวอยู่ที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายในแผ่นวุ้นจะมีเซลล์ของ *Acetobacter xylinum* ซึ่งถูกห่อหุ้มอยู่ จึงเกิดข้อสันนิษฐานว่า การที่เชื้อสร้างเซลลูโลสเพราะต้องการใช้เซลลูโลสเป็นตัวทำให้เชื้อเกิดการลอยตัวเพื่อสัมผัสกับอากาศที่ผิวหน้ามากขึ้น เพราะ *Acetobacter xylinum* เป็นเชื้อที่ต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต บางรายงานเสนอว่า เซลลูโลสช่วยป้องกันแสงยูวีที่จะมาทำลายเชื้อ ช่วยป้องกันเซลล์และต่อสู้กับเชื้อชนิดอื่น ในระดับอุตสาหกรรมจะทำการเลี้ยง *Acetobacter xylinum* ในถังหมักเพื่อให้ประโยชน์ของเซลลูโลสที่ได้ในแง่ของการเป็นสารไบโอพอลิเมอร์ สิ่งหนึ่งที่เป็นปัญหาในการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* เพื่อผลิตเซลลูโลส คือ ความแปรผันของเชื้อเมื่อทำการเลี้ยงและต่อเชื้อเป็นระยะเวลานาน จากเชื้อที่เคยผลิตเซลลูโลสได้ที่เรียกว่า cellulose-producing culture หรือ  $Cel^+$  อาจจะมีผลิตได้น้อยลงหรือไม่ผลิตเลยซึ่งเรียกว่า celluloseless mutant หรือ  $Cel^-$  (Asai, 1968) การแปรผันของเชื้ออาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ ในการทดลองนี้ได้ศึกษาถึงภาวะในการเลี้ยงที่จะมีผลต่อการแปรผันของเชื้อ *Acetobacter xylinum* และผลที่เกิดขึ้นจากการแปรผัน

## วารสารปริทัศน์

2.1 *Acetobacter xylinum*

*Acetobacter xylinum* เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม acetic acid bacteria เชื้อบางชนิดในกลุ่มนี้ใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตน้ำส้มสายชู เชื้อในกลุ่มของ *Acetobacter* มีลักษณะเซลล์เป็นแท่ง (rod) ตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีขนาดประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน x 1.0-1.4 ไมครอน พบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสาย ลักษณะอื่นที่พบในบางสายพันธุ์ (strain) คือ เซลล์มีลักษณะกลม ยาว มีการพองตัว เป็น club-shaped โค้งหรือเป็นสาย เซลล์เคลื่อนที่หรือไม่เคลื่อนที่ก็ได้ ถ้าเคลื่อนที่จะอาศัยแฟลกเจลลา (flagella) ชนิด peritrichous หรือ lateral ไม่พบการสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) เซลล์ย้อมติดสีแกรมลบแต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจย้อมติดได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญ (obligately aerobic) โคโคนี้มีสีซีดจาง ส่วนใหญ่ไม่มีการสร้างเม็ดสี ยกเว้นบางชนิดที่มีการสร้างเม็ดสีที่ละลายน้ำได้ สีน้ำตาลหรือสีชมพู ผลิตเอนไซม์คาตาเลสได้ สามารถออกซิไดส์เอทานอลให้เป็นกรดอะซิติกได้และบางชนิดยังสามารถออกซิไดส์กรดอะซิติกให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำต่อไปได้อีก เรียกว่าการเกิดโอเวอร์ออกซิเดชัน (overoxidation) สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดสำหรับการเจริญ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 25-30°C pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.4-6.3 *Acetobacter* สามารถพบได้ในธรรมชาติโดยเฉพาะในพืชผัก ผลไม้ ที่สามารถเกิดการหมักเป็นแอลกอฮอล์ได้ ลักษณะเด่นของ *Acetobacter xylinum* คือ สามารถผลิตเซลลูโลสได้ โดยในชั้นแรกกลูโคสจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ต่อกันเป็นสายพอลิกลูโคแซน แล้วจึงถูกส่งออกนอกเซลล์ในชั้นที่สองและการพอลิเมอไรซ์ก็จะดำเนินต่อไปจนได้เป็นสายของเซลลูโลสที่มีลักษณะโครงสร้างที่แข็งแรงและมีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ (De Ley, Swings, and Gossele, 1984)

2.2 การจำแนกชนิดของ *Acetobacter*

การจำแนกชนิดของ *Acetobacter* ได้มีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงมาอย่างต่อเนื่อง มีหลายงานวิจัยที่พยายามศึกษาถึงสมบัติของ *Acetobacter* ทั้งทางด้านสรีรวิทยา ชีวเคมีและทางพันธุกรรม เพื่อจำแนกชนิดของ *Acetobacter* ให้สมบูรณ์ เช่น Breed, Murray และ Smith (1957) ใน Bergey's

manual of determinative bacteriology 7<sup>th</sup> edition แบ่ง *Acetobacter* เป็น 7 กลุ่ม 9 สปีชีส์ โดยจัด *Acetobacter xylinum* เป็นหนึ่งในสปีชีส์ของ *Acetobacter*

De Ley และ Frateur (1974) ใน Bergey's manual of determinative bacteriology 8<sup>th</sup> edition แบ่ง *Acetobacter* เป็น 3 สปีชีส์ โดยจัด *Acetobacter xylinum* เป็นหนึ่งในสปีชีส์ของ *Acetobacter acetii* และให้ใช้ชื่อว่า *Acetobacter acetii* subsp. *xylinum*

Holt และคณะ (1994) ใน Bergey's manual of determinative bacteriology 9<sup>th</sup> edition แบ่ง *Acetobacter* เป็น 7 สปีชีส์ โดยจัด *Acetobacter xylinum* เป็นหนึ่งในสปีชีส์ของ *Acetobacter* อีกครั้ง

### 2.3 วุ้นมะพร้าว

วุ้นมะพร้าวหรือที่เรียกว่า วุ้นน้ำมะพร้าว วุ้นสวรรค์ วุ้นน้ำส้มหรือเห็ดรัสเซีย เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำมะพร้าวแก่ด้วยเชื้อแบคทีเรียจำพวกเดียวกับแบคทีเรียที่สร้างกรดน้ำส้มโดยแบคทีเรียที่สร้างวุ้นมะพร้าวนี้มีชื่อว่า *Acetobacter xylinum* อยู่ในสกุล *Acetobacter* spp. เรียกทั่วไปว่าอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย ชาวฟิลิปปินส์ได้นำเชื้อ *Acetobacter xylinum* มาหมักน้ำมะพร้าวหรือน้ำผลไม้ เช่น น้ำสับปะรด จนได้วุ้นเกิดขึ้นภายหลังจากตั้งทิ้งไว้ แผ่นวุ้นที่ได้มีลักษณะเป็นเยื่อเหนียวที่เรียกว่า cartilaginous substance เรียกวุ้นที่ได้จากน้ำมะพร้าวว่า nata de coco และเรียกวุ้นที่ได้จากน้ำสับปะรดว่า nata de pina (วารวูฒิ ครูสง, 2539)

จากการศึกษาถึงส่วนประกอบของวุ้นมะพร้าวที่ได้จากเชื้อ *Acetobacter xylinum* พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เป็นเซลลูโลสและไม่มีลิกโนเซลลูโลส (Arunoros, 1976)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

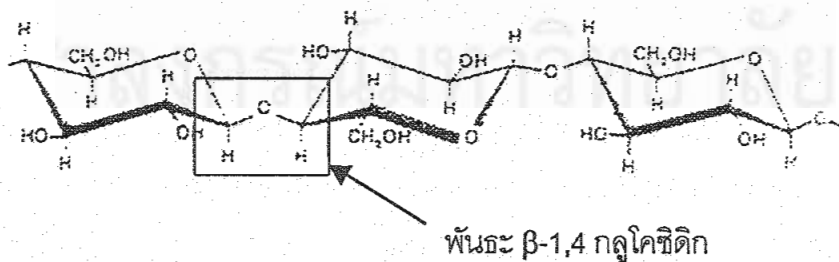
ตารางที่ 2.1 : องค์ประกอบของวุ้นมะพร้าวที่ได้จากเชื้อ *Acetobacter xylinum*

องค์ประกอบ	ปริมาณ
คาร์โบไฮเดรต	3.00%
ไขมัน	0.05%
เส้นใย	1.10%
โปรตีน	0.68%
เถ้า	0.77%
น้ำ	94.40%
แคลเซียม	34.50 มก.
ธาตุเหล็ก	0.20 มก.
ฟอสฟอรัส	22.00 มก.
วิตามินบี 1	0.10 มก.
วิตามินบี 2	0.02 มก.
ไนอาซิน	0.22 มก.

ที่มา : Arunoros (1976)

## 2.4 เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่ประกอบขึ้นจากการจับตัวกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 กลูโคซิดิก ( $\beta$ -1,4 glucosidic bond) ของกลูโคสหลายหน่วย

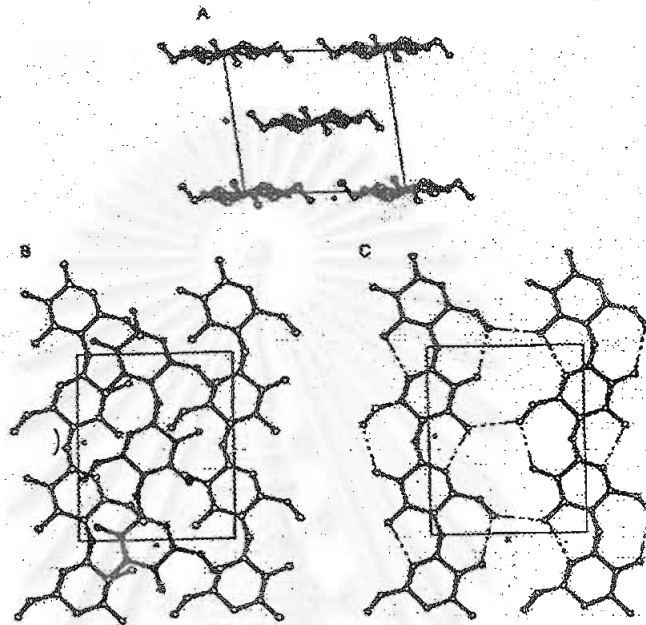


รูปที่ 2.1 : พันธะ  $\beta$ -1,4 กลูโคซิดิก

ที่มา : Valla (1995)



กลูโคสที่ต่อกันเป็นสายยาวเรียกว่า สายพอลิกลูโคแซน (polyglucosan chain) แต่ละสายพอลิกลูโคแซนจะเชื่อมกันเองด้วยพันธะไฮโดรเจนเกิดเป็นเซลล์ลูโลสไฟบริล (cellulose fibril) ซึ่งเป็นโครงสร้าง 3 มิติที่ไม่ละลายน้ำ

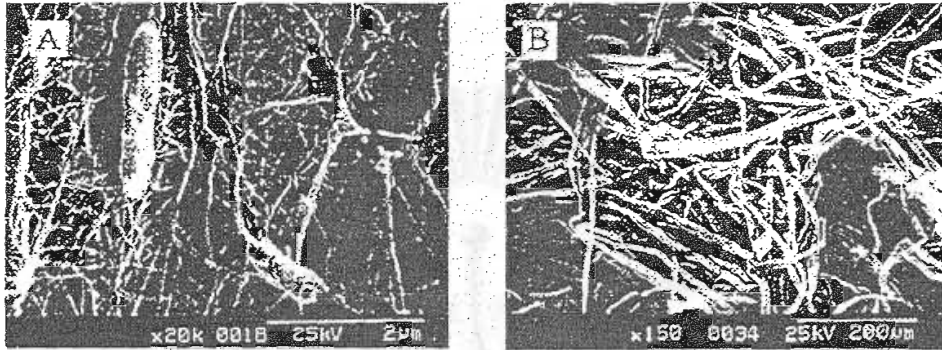


รูปที่ 2.2 : โครงสร้างของ celluloseI (A) ระนาบ ab (ตามแนวของสายพอลิเมอร์); (B) ระนาบ ac; (C) ร่างแหของพันธะไฮโดรเจนในระนาบ ac  
ที่มา : Ross, Mayer, and Benziman (1991)

เซลล์ลูโลสมีลักษณะโครงสร้างได้หลายแบบ ขึ้นอยู่กับการฟอร์มตัวเอง แต่เมื่อใช้ x-ray crystallography ตรวจสอบวิเคราะห์โครงสร้าง พบว่าเซลล์ลูโลสที่ได้จากธรรมชาติ ส่วนใหญ่มีโครงสร้างที่มีการเรียงตัวของสายพอลิกลูโคแซนไปในทิศทางเดียวกัน จึงให้ชื่อว่า celluloseI ส่วนเซลล์ลูโลสอีกชนิดหนึ่งซึ่งเกิดจากการฟอร์มตัวขึ้นเองอีกครั้งหลังจากการละลายด้วยสารเคมี จะเรียกว่า celluloseII ซึ่งการเรียงตัวของสายพอลิกลูโคแซนจะเป็นไปในทิศทางตรงกันข้าม (Ross et al., 1991)

เมื่อใช้กล้อง scanning electron microscope ส่องดูเซลล์ลูโลสไฟบริล จะพบว่าสามารถแบ่งได้เป็นส่วนย่อยที่เรียกว่าไมโครไฟบริล (microfibril) ที่มีความกว้างตั้งแต่ 1-25 นาโนเมตร ประกอบด้วยสายพอลิกลูโคแซนตั้งแต่ 10-250 สาย ยาวตั้งแต่ 1-9 ไมครอน มีกลูโคสตั้งแต่ 2,000-18,000 หน่วย (Valla, 1995)

เซลลูโลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียหรือ bacterial cellulose ประกอบด้วย ultrafine fiber ซึ่งสานกันเป็นร่างแหแบบ ultrafine network จากรูปที่ 2.3 จะเห็นว่า ultrafine fiber ของ bacterial cellulose มีขนาดเล็กกว่า ultrafine fiber จากพืช ประมาณ 1/10-1/1,000 เท่า (Yoshinaga et al., 1997)

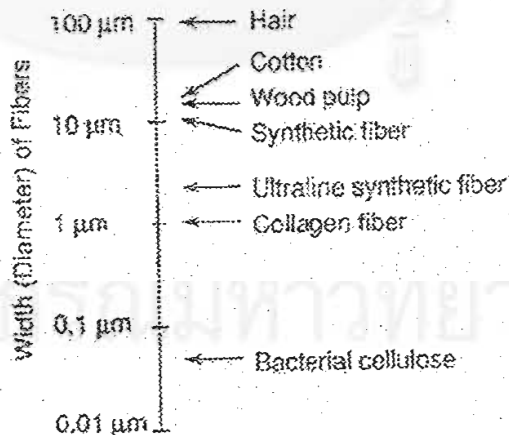


รูปที่ 2.3 : ภาพเส้นใยเซลลูโลสจากกล้อง scanning electron microscope

A - เซลลูโลสจากแบคทีเรีย, B - เซลลูโลสจากพืช

ที่มา : Yoshinaga et al. (1997)

ในรูปที่ 2.4 แสดงถึงการเปรียบเทียบขนาดของเซลลูโลสไฟบริลที่ได้จากแหล่งต่างๆ พบว่าเซลลูโลสไฟบริลที่ได้จากแบคทีเรียมีขนาดเล็กที่สุดและมีขนาดเป็น 1 ใน 10 เท่า เมื่อเทียบกับเซลลูโลสที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี



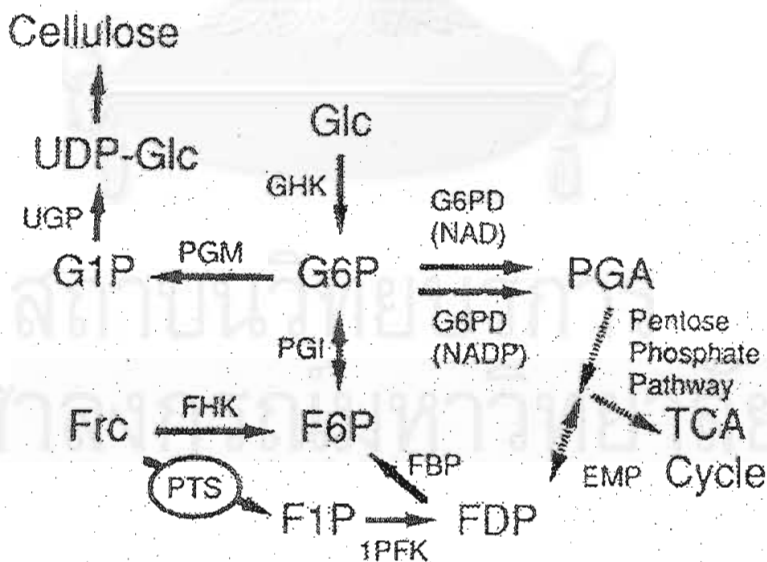
รูปที่ 2.4 : เปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางของไฟเบอร์จาก bacterial cellulose กับไฟเบอร์สังเคราะห์ชนิดต่างๆ

ที่มา : Yoshinaga et al. (1997)

## 2.5 ชื่อเคมีและลักษณะทางกายภาพของการผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter xylinum*

*Acetobacter xylinum* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดในการผลิตเซลลูโลส เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ พอลิแซ็กคาไรด์ น้ำตาลแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารตัวกลาง (intermediate) คือ กลูโคส-6-ฟอสเฟต (glucose-6-phosphate: G6P) โดยการผ่านเข้าสู่ตอนใดตอนหนึ่งของวิถีเมตาบอลิซึมหลักของเชื้อ อันได้แก่ pentose phosphate pathway, Kreb's cycle, glycolysis, gluconeogenesis และ Embden-Meyerhof Pamas pathway เป็นต้น (Ross et al, 1991)

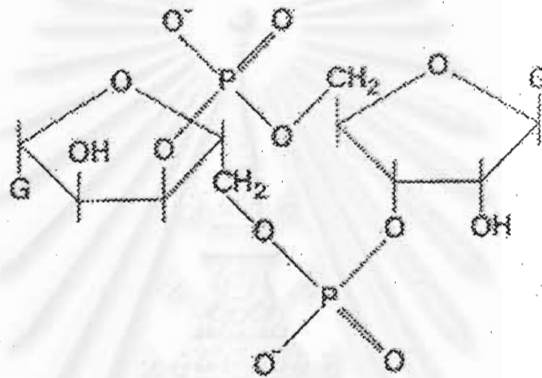
G6P จะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคส-1-ฟอสเฟต (glucose-1-phosphate: G1P) ด้วยเอนไซม์ ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (phosphoglucomutase: PGM) และ G1P จะถูกเปลี่ยนต่อให้เป็นยูริดีนไดฟอสโฟกลูโคส (uridinediphosphoglucose: UDP-glucose) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการสร้างเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ยูริดีนไดฟอสโฟกลูโคสไพโรฟอสโฟริเลส (UDP-glucose pyrophosphorylase: UGP) UDP-glucose จะถูกนำมาต่อกันเป็นสายเซลลูโลสโดยการทำงานของ cellulose synthase ที่อยู่บนบริเวณพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ของเซลล์ (Yoshinaga et al., 1997)



รูปที่ 2.5 : เส้นทางการสังเคราะห์เซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*

ที่มา : Yoshinaga et al. (1997)

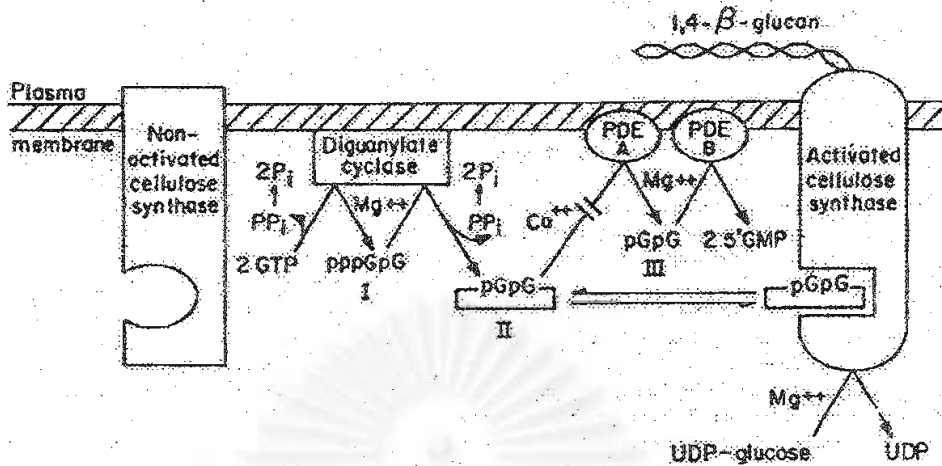
โดยปกติ cellulose synthase จะอยู่ในรูป non-activated cellulose synthase ซึ่งจะถูกระตุ้นให้เปลี่ยนเป็น activated cellulose synthase และเกิดการทำงานได้โดย cyclic diguanylic acid monophosphate (c-di-GMP) ที่สร้างจาก GTP 2 โมเลกุลโดยเอนไซม์ diguanylate cyclase c-di-GMP เป็นสารตัวสำคัญที่มีบทบาทควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลสใน *Acetobacter xylinum* ในการศึกษาแบบ in vitro พบว่าการเติม c-di-GMP เข้าไปในระบบเพียงเล็กน้อยเท่านั้นก็สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลลูโลสได้ถึง 50-200 เท่า (Valla, 1995)



รูปที่ 2.6 : โครงสร้างของ c-di-GMP

ที่มา : Valla (1995)

อย่างไรก็ตามพบว่า c-di-GMP จะกระตุ้นการทำงานของ cellulose synthase ได้ก็ต่อเมื่อภายในระบบมีแคลเซียมไอออน ( $\text{Ca}^{2+}$  ion) ในปริมาณมากเพียงพอที่จะยับยั้งการทำงานของ phosphodiesterase A (PDE A) ได้ PDE A ทำหน้าที่เป็น negative regulator ต่อการสังเคราะห์เซลลูโลส ตรงข้ามกับ c-di-GMP ที่เป็น positive regulator PDE A จะทำให้ c-di-GMP เปลี่ยนเป็น pGpG (di-GMP) ซึ่งเป็น linear molecule ในขณะที่ PDE B จะเปลี่ยน pGpG ต่อให้เป็น GMP 2 โมเลกุล (Ross et al., 1991)

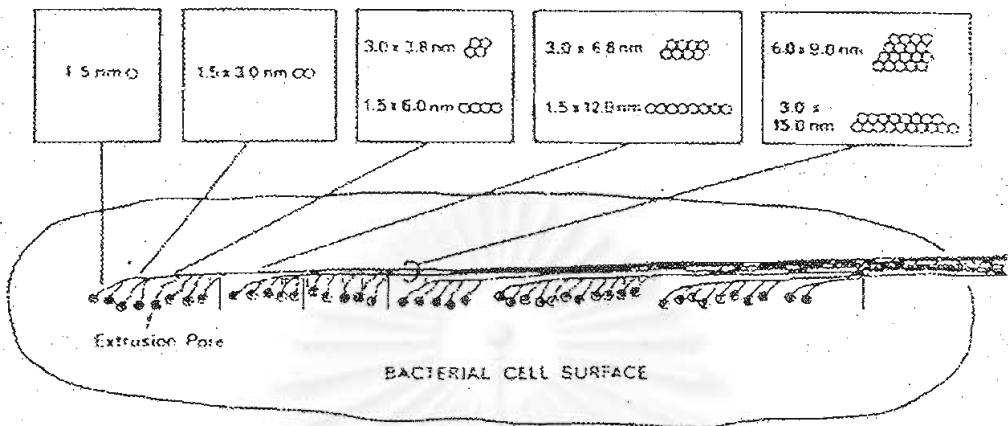


รูปที่ 2.7 : โมเดลระบบควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลสใน *Acetobacter xylinum*

ที่มา : Ross et al. (1991)

*Acetobacter xylinum* ถูกใช้เป็นแบบ (model) ในการศึกษาลักษณะทางกายภาพของการสังเคราะห์เซลลูโลส เมื่อใช้กล้อง electron microscope ส่องดูที่บริเวณส่วนผิวของเซลล์ พบว่ามีโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นรูอยู่ 50-80 แห่ง เรียงตัวอยู่ตามแนวยาวของเซลล์ โครงสร้างที่เป็นรูนี้เป็นทางออกของสายพอลิกลูโคแซนประมาณ 10-15 สายที่เกาะกลุ่มกัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 นาโนเมตร ซึ่งสายพอลิกลูโคแซน 10-15 สายนี้ เป็นหน่วยย่อยเริ่มต้นในการเกิดเป็นเซลลูโลส สายพอลิกลูโคแซนที่ออกมาจากรูแต่ละอันจะเกิดการรวมตัวกันจนได้เป็นสายของไฟบริลที่พันกันอยู่อย่างหลวมๆ (loosely wound ribbon of fibrils) มีสายพอลิกลูโคแซนประกอบอยู่ประมาณ 1,000 สาย เซลลูโลสที่ได้จะขยายยาวต่อไปเรื่อยๆ โดยจะติดอยู่กับเซลล์ แม้กระทั่งเมื่อเซลล์เกิดการแบ่งตัว (Valla, 1995)

กรรมมหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.8 : โมเดลทั่วไปแสดงการจัดเรียงตัวของสายไฟเบอร์ใน *Acetobacter xylinum*  
ที่มา : Valla (1995)

เมื่อเลี้ยง *Acetobacter xylinum* ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบในการหมักแบบวางนิ่ง ในวันแรกเชื้อจะใช้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวสร้างสายเซลลูโลส (insoluble polyglucosan chain) และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ เมื่อสายเซลลูโลสดังกล่าวมีจำนวนมากขึ้นก็จะสานและรวมตัวกันจนเห็นเป็นเส้นใยสีขาวขุ่นที่ค่อยๆ ลอยขึ้นสู่มิวน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะนี้อาหารเหลวจะขุ่นและยังไม่ปรากฏแผ่นวุ้นบนผิวหน้าของอาหาร จากนั้นในวันที่ 2 ของการเลี้ยงอาหารเหลวจะเริ่มใสขึ้นและเส้นใยดังกล่าวจะเริ่มสานตัวกันเกิดเป็นร่างแหของเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นแผ่นวุ้นเซลลูโลสสีขาวขุ่นลอยอยู่บนผิวหน้าของอาหารเหลว เนื่องจาก *Acetobacter xylinum* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญและการที่อาหารเหลวมีความใสขึ้นในเวลาเดียวกันกับการปรากฏของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่บริเวณผิวหน้าของอาหารเหลว จึงเกิดข้อสันนิษฐานว่าแผ่นวุ้นดังกล่าวทำหน้าที่พาเซลล์แบคทีเรียขึ้นสู่มิวน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีความเข้มข้นของออกซิเจนสูงกว่า โดยอาศัยฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียและถูกกักเก็บไว้ในโครงสร้างที่เป็นร่างแหของแผ่นวุ้น (Schramm and Hestrin, 1954) จากการทดลองของ Schramm และ Hestrin (1954) พบว่าเชื้อจะสร้างชั้นของแผ่นวุ้นใหม่ขึ้นบนแผ่นวุ้นด้านที่สัมผัสกับอากาศ และชั้นของแผ่นวุ้นเก่าจะจมลงสู่ด้านล่าง

ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนว่าเพราะสาเหตุใด เชื้อจึงเกิดการสร้างเซลลูโลส บางรายงานการทดลองเสนอว่า เซลลูโลสจะช่วยให้เชื้อเกิดการลอยตัวขึ้นมาสัมผัสกับอากาศได้มากขึ้น เซลลูโลสช่วยป้องกันแสงยูวีที่จะมาทำลายเชื้อ เซลลูโลสช่วยป้องกันเซลล์และต่อสู้กับเชื้อชนิดอื่น แต่ในธรรมชาติ เซลลูโลสมีหน้าที่ได้หลายอย่าง ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เชื้ออยู่และชนิดของเชื้อที่สร้างเซลลูโลสด้วย เพราะมีเชื้อชนิดอื่นอีกที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ เช่น *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina* เป็นต้น

## 2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum*

วุ้นมะพร้าวที่มีคุณภาพดี คือ มีลักษณะเนื้อที่เนียนนุ่มและเหนียวพอเหมาะ ไม่เป็นกากใย ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตวุ้นมะพร้าวให้ได้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี มีดังต่อไปนี้

### 2.6.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรียและคุณภาพของหัวเชื้อที่ใช้ในการหมัก

*Acetobacter xylinum* เป็นแบคทีเรียในสกุล *Acetobacter* ซึ่งมีความสามารถในการสร้างกรดน้ำส้มสายชูหรือกรดอะซิติกได้ดี ดังนั้นในการผลิตวุ้นมะพร้าวให้ได้ผล จะต้องเลือกใช้หัวเชื้อสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้สูงในระยะเวลาสั้น และสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติกหรือกรดกลูโคนิกในปริมาณต่ำ นอกจากนี้เชื้อที่ใช้ควรจะต้องมีความเสถียรหรือให้ผลผลิตในปริมาณสูงอย่างสม่ำเสมอ ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมได้ดีและสามารถใช้น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกได้ คุณภาพของหัวเชื้อ ได้แก่ ความบริสุทธิ์ของหัวเชื้อและความสามารถในการผลิตแผ่นวุ้นเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อผลผลิตที่ได้เป็นอันมาก ดังนั้นผู้ผลิตจะต้องทำการคัดเลือกและแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อยู่เสมอ (สมคิด ธรรมรัตน์, 2531)

### 2.6.2 ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น

การผลิตวุ้นมะพร้าวให้ได้ผลดีนอกจากควรใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกที่เหมาะสมแล้ว ปริมาณเชื้อที่ใช้จะต้องมีมากพอเพื่อให้เชื้อเจริญได้อย่างรวดเร็วจนมีปริมาณมากเกินกว่าเชื้ออื่นๆ ที่อาจติดมากับน้ำมะพร้าวหรือการปนเปื้อนในระหว่างการผลิต โดยปริมาณเชื้อที่เหมาะสมซึ่งจะให้ผลผลิตสูงที่สุดอยู่ในช่วงร้อยละ 10-20 ถ้าใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นมากกว่านี้ จะทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง (Alaban, 1962)

### 2.6.3 น้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวที่ใช้ควรมาจากมะพร้าวแก่ เนื่องจากเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมที่หาได้ง่ายและมีคุณค่าสูง เหมาะสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย โดยเลือกน้ำมะพร้าวที่สดและใหม่ มีไขมันน้อย ไม่มีการปนเปื้อนของน้ำมะพร้าวที่เน่าเสีย ก่อนใช้ต้องนำมาต้มให้เดือดให้ไขมันละลายและเป็นการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจปะปนมา (สมคิด ธรรมรัตน์, 2531)

### 2.6.4 แหล่งคาร์บอน

*Acetobacter xylinum* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ น้ำตาลเชิงซ้อน น้ำตาลแอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ แม้ว่าน้ำมะพร้าวแก่จะมีน้ำตาลซึ่งส่วนมากเป็นน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตสและซูโครสอยู่ถึง 3% แต่เนื่องจากปริมาณน้ำตาลดังกล่าวในน้ำมะพร้าวไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และความอ่อนแก่ของมะพร้าว ดังนั้นจึงต้องเติมน้ำตาลลงในน้ำมะพร้าวเพื่อให้แน่ใจว่ามีปริมาณคาร์บอนมากพอสำหรับการเจริญและการสร้างแผ่นวุ้นของเชื้อ (วรารุณี ครุสง, 2539) เนื่องจากซูโครสเป็นน้ำตาลที่หาง่ายและมีราคาถูกอีกทั้งแผ่นวุ้นที่ได้จากการใช้น้ำตาลซูโครสก็มีลักษณะหนาและเนื้อแน่น ดังนั้นในการผลิตวุ้นมะพร้าวจึงนิยมใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-8% ซึ่งให้ความหนาของแผ่นวุ้นสูงที่สุดและให้ผลคุ้มค่าในทางการค้า ถ้าใช้น้ำตาลน้อยกว่า 5% จะทำให้ได้วุ้นมะพร้าวที่เหนียว แต่ถ้าใช้ปริมาณน้ำตาลสูงกว่านี้จะมีน้ำตาลเหลือใช้มากทำให้สิ้นเปลืองและยากต่อการบำบัด

### 2.6.5 แหล่งไนโตรเจน

ตามธรรมชาติแล้วน้ำมะพร้าวมีสารประกอบไนโตรเจนในรูปของโปรตีนอยู่ประมาณร้อยละ 0.4 (วรารุณี ครุสง, 2539) ซึ่งจะช่วยให้ *Acetobacter xylinum* เจริญและสร้างแผ่นวุ้นได้แม้ไม่เติมไนโตรเจนเพิ่มลงไปก็ตาม แต่การเติมสารประกอบไนโตรเจนเพิ่มลงไปในน้ำมะพร้าวก็น่าจะช่วยเร่งให้เชื้อผลิตแผ่นวุ้นได้หนาในระยะเวลาสั้นและช่วยให้เชื้อเจริญได้ดี โดยสารประกอบไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) รองลงมาคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) แต่เนื่องจากไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตละลายยาก ดังนั้นแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตจึงเหมาะสมกว่า โดยปริมาณที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.05-0.1% อย่างไรก็ตามในอุตสาหกรรมการผลิตวุ้นมะพร้าวนิยมใช้แอมโมเนียมซัลเฟตมากกว่าเนื่องจากมีราคาถูก



### 2.6.6 สารประกอบแมกนีเซียม

แมกนีเซียมไอออน ( $Mg^{2+}$  ion) สามารถกระตุ้นให้ *Acetobacter xylinum* ผลิตเซลลูโลสได้ดีขึ้น โดยชนิดและปริมาณของสารประกอบแมกนีเซียมที่เหมาะสมคือ แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ที่ความเข้มข้น 0.05% (Alaban, 1962)

### 2.6.7 ความเป็นกรดต่าง (pH)

ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ แม้ว่า *Acetobacter xylinum* สามารถเจริญได้ในช่วง pH 3.5-7.5 แต่ pH ที่เหมาะสมต่อการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสจะอยู่ในช่วง 4.5-6.0 (Alaban, 1962) นอกจากนี้การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้กรด เช่น กรดอะซิติก ยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จากรายงานของ Alaban (1962) พบว่า การเติมกรดอะซิติกร้อยละ 1 ช่วยป้องกันการปนเปื้อนจาก *Aspergillus* sp. ได้ และเมื่อเพิ่มปริมาณเป็นร้อยละ 2 จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนจาก *Penicillium* sp. และ *Bacillus* sp. ได้

ในระหว่างการหมัก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารที่ใช้เลี้ยงจะค่อยๆ ลดลงเนื่องจากกรดกลูโคสิกและกรดอะซิติกที่เชื้อสร้างขึ้น เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้นเชื้อจะผลิตกรดกลูโคสิกมากขึ้นและส่งผลให้ความเป็นกรดต่างของอาหารลดลงมาก แม้ว่าการเติมกรดกลูโคสิกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสของเชื้อแต่การที่เชื้อเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดกลูโคสิกจะทำให้มีสารตั้งต้นสำหรับการสร้างเซลลูโลสน้อยลง (Masaoka, Ohe, and Sakota, 1993)

### 2.6.8 อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างวุ้นมะพร้าวอยู่ในช่วง  $28-32^{\circ}C$  เนื่องจากการสร้างแผ่นวุ้นสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเชื้อเป็นอย่างมาก ดังนั้นการสร้างแผ่นวุ้นจะเกิดได้เร็วเมื่อเชื้อเจริญได้ดี อุณหภูมิที่ต่ำกว่าหรือสูงกว่าช่วงนี้มากๆ ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจะทำให้ได้แผ่นวุ้นที่มีความบางและเหนียว โดยเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำกว่า  $20^{\circ}C$  และสูงกว่า  $35^{\circ}C$  การสร้างแผ่นวุ้นจะไม่เกิดขึ้นเลย (Alaban, 1962)

### 2.6.9 ออกซิเจน

เนื่องจาก *Acetobacter xylinum* ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ดังนั้นการหมักเพื่อให้เชื้อเจริญและสร้างแผ่นวุ้นได้ดีจึงต้องหมักในภาชนะที่มีผิวหน้ากว้างเพื่อให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสของอากาศกับอาหารเลี้ยงเชื้อมากๆ นอกจากนี้ควรใช้วัสดุที่มีการระบายอากาศได้ดี เช่น กระดาษหนังสือพิมพ์หรือผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้วปิดปากภาชนะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนในระหว่างการหมัก (สมคิด ธรรมรัตน์, 2531)

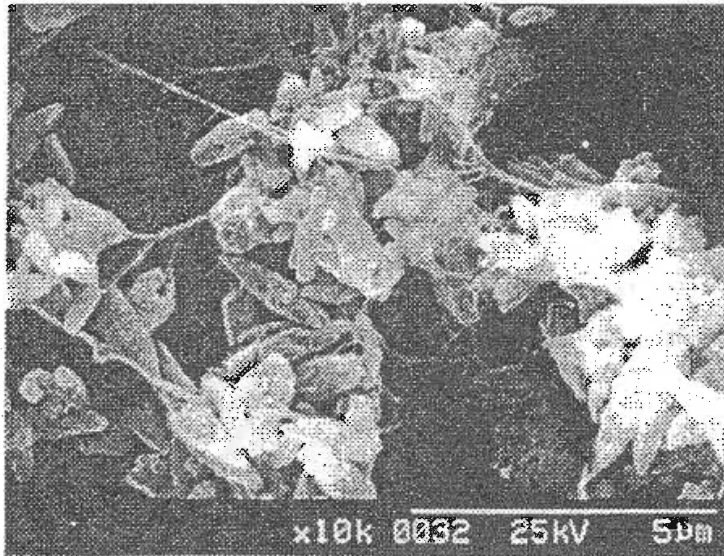
### 2.7 การใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสที่ผลิตโดย *Acetobacter xylinum*

ในปัจจุบันผลผลิตวุ้นมะพร้าวส่วนใหญ่ของประเทศถูกนำไปแปรรูปเป็นอาหารหวาน คือผลิตภัณฑ์วุ้นมะพร้าวเชื่อม และอาหารคาวโดยการใช้วุ้นมะพร้าวแทนเนื้อปลาหมึกหรือแมงกะพรุนที่สามารถใช้เป็นอาหารมังสวิรัตได้ (สมคิด ธรรมรัตน์, 2531) ในอุตสาหกรรมอาหารนอกเหนือจากการนำวุ้นมะพร้าวมาบริโภคโดยตรงแล้ว เซลลูโลสในวุ้นมะพร้าวยังถูกนำมาใช้เป็นสารให้ความข้นหนืดเพื่อปรับปรุงเนื้อสัมผัสของอาหาร และทำหน้าที่เป็นสารที่ช่วยให้เกิดการกระจายตัวเพื่อป้องกันการละลายของไอศกรีม

อย่างไรก็ตาม วุ้นมะพร้าวซึ่งเป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียกำลังได้รับความสนใจในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากคุณสมบัติบางอย่างของเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่เหมือนกับเซลลูโลสจากพืช เช่น มีน้ำหนักเบาแต่มีความทนทานสูง สามารถตัดและทำให้โค้งงอเป็นรูปต่างๆ ได้ นอกจากนี้เซลลูโลสจากแบคทีเรียยังดีกว่าเซลลูโลสจากพืชตรงที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า ไม่มีลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเพคติกเป็นองค์ประกอบ ทำให้ไม่ต้องนำไปผ่านขั้นตอนการแยกเซลลูโลส (Valla, 1995)

แผ่นเซลลูโลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปอบแห้ง มีค่า Young's modulus สูงและมีสมบัติการลดเสียงรบกวน (internal loss) สูง แต่มีความหนาแน่นต่ำทำให้คลื่นเสียงที่ผ่านมีความเร็วสูง จึงถูกนำมาใช้เป็นกระดาดลำโพง (acoustic transducer diaphragm) ในทางการแพทย์เซลลูโลสจากแบคทีเรียถูกนำไปใช้ในการทำผิวหนังเทียมเพื่อปกปิดบาดแผลชั่วคราว เพราะเซลลูโลสจากแบคทีเรียมีความแข็งแรงสูงเมื่อเปียกน้ำ สามารถให้อากาศและน้ำผ่านได้ไม่ระคายเคืองต่อผิวหนัง ถ้านำแผ่นเซลลูโลสที่ได้มาตีป่นด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ จะทำให้ได้เซลลูโลสในลักษณะที่เรียกว่า "disintegrated bacterial cellulose" ซึ่งสามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย เช่น ในอุตสาหกรรมการทำกระดาดที่มีการผสมผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนต โดยโครงสร้างที่เป็นร่างแห

ของเซลล์จากแบคทีเรียจะเป็นตัวจับผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนตเอาไว้ให้คงอยู่ในกระดาด (Yoshinaga et al., 1997) ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 : โครงสร้างที่ผิวกระดาดที่มีส่วนผสมของเซลล์จากแบคทีเรียและผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนต  
ที่มา : Yoshinaga et al. (1997)

การผลิตเซลล์จากแบคทีเรียในระดับห้องทดลองจะทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อในภาชนะนิ่ง (static culture) ซึ่งจะให้ประสิทธิภาพที่ต่ำถ้าจะทำได้ในระดับอุตสาหกรรม แต่ข้อดีของการเลี้ยงเชื้อแบบนิ่ง คือ การลดการปะปนกันระหว่างเชื้อที่สร้างเซลล์ (Cel<sup>+</sup> cell) กับเชื้อที่ไม่สร้างเซลล์ (Cel<sup>-</sup> mutant) เพราะเชื้อที่สร้างเซลล์ก็จะถูกพันด้วยเซลล์และลอยขึ้นสู่ผิวหน้าของอาหาร ในขณะที่เชื้อที่ไม่สร้างเซลล์ก็จะสะสมอยู่ในอาหารเหลวได้แผ่นวุ้น ทำให้เชื้อที่ไม่สร้างเซลล์ไม่สามารถรบกวนการเจริญเติบโตและการสร้างเซลล์ของเชื้อปกติได้ ซึ่งถ้าทำการเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมที่ต้องเลี้ยงเชื้อในถังหมัก (fermentor) ในภาวะที่มีการกวนอยู่เสมอเพื่อให้ออกซิเจน ก็จะทำให้เกิดการสะสมของเชื้อที่ไม่สร้างเซลล์ปะปนอยู่ด้วย การแก้ปัญหาหมักจะทำโดยการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *Acefobacter xylinum* และการพัฒนาลักษณะทางพันธุกรรม เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเซลล์สูงและมีความคงตัวสูง (Valla, 1995)

ถึงแม้ว่าเซลล์โอสจากแบคทีเรียจะไม่ถูกคาดหวังว่าจะใช้ทดแทนเซลล์โอสจากพืชได้ทั้งหมด แต่ในอนาคตถ้ามีการศึกษาและทำความเข้าใจระบบการสังเคราะห์เซลล์โอสจากแบคทีเรียในระดับโมเลกุลควบคู่ไปกับการพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตมากขึ้น เซลล์โอสจากแบคทีเรียก็อาจจะได้รับความนิยมน้อย่างกว้างขวางยิ่งขึ้นก็เป็นได้

## 2.8 การแปรผันของ *Acetobacter xylinum*

การแปรผันของเชื้อในกลุ่ม *Acetobacter* มีการค้นพบมานาน เช่นในการทดลองของ Schramm และ Hestrin (1954) ซึ่งศึกษาถึงผลของรอยต่อระหว่างอากาศกับอาหารเหลวที่มีต่อการผลิตเซลล์โอสโดยเชื้อ *Acetobacter xylinum* ทำการเลี้ยงเชื้อในภาชนะนิ่งและภาชนะเขย่า เปรียบเทียบลักษณะการสร้างวุ้นเซลล์โอส หลังจากทำการเลี้ยงและต่อเชื้อในภาชนะเขย่าเป็นระยะเวลาหนึ่งพบว่าเชื้อเริ่มมีการเจริญแบบชूनและมีการสร้างเซลล์โอสลดลง ลักษณะของเซลล์โอสที่ได้แตกต่างไปจากเดิม จึงแยกเพื่อนั้นออกมาทดลองเลี้ยงในภาชนะนิ่ง ก็พบว่าเชื้อสร้างวุ้นที่มีความหนาน้อยลงจากเชื้อตั้งต้น ในการทดลองนี้ Schramm และ Hestrin ได้แบ่ง *Acetobacter xylinum* ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะโคโลนีที่พบ คือ Intermediate, Celluloseless I และ Celluloseless II ซึ่งทั้ง 3 กลุ่มนี้มีการเจริญแบบกระจายเมื่อเลี้ยงในภาชนะเขย่าและผลิตแผ่นวุ้นที่มีความหนาน้อยลงเมื่อเลี้ยงในภาชนะนิ่ง แต่ลักษณะของแผ่นวุ้นที่ได้จาก Intermediate จะยังคงมีลักษณะเดิมของแผ่นวุ้นที่ได้จากเชื้อตั้งต้น คือ ไม่ละลายหรือเปลี่ยนรูปเมื่อต้มในสารละลายไฮโดรเจนไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4% แต่ลักษณะของแผ่นวุ้นที่ได้จาก Celluloseless I และ Celluloseless II จะละลายเมื่อต้มในภาวะเดียวกัน เมื่อนำเชื้อที่เกิดการแปรผันนี้มาทดสอบสมบัติการเป็น *Acetobacter* พบว่ายังคงมีสมบัติเหมือนเดิม จึงอาจกล่าวได้ว่า การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อเชื้อแปรผันนี้เกิดเฉพาะส่วนของการสังเคราะห์เซลล์โอสไม่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ในส่วนอื่นๆ ซึ่งถ้าเป็นการเลี้ยงเชื้อในภาชนะนิ่งในการทดลองนี้พบว่า เชื้อยังคงมีลักษณะเหมือนเดิมแม้ว่าจะผ่านการต่อเชื้อมาหลายครั้ง ก็ตาม

Steel และ Walker (1957a) ศึกษาถึงภาวะที่มีผลต่อการแปรผันของ *Acetobacter xylinum* โดยใช้เชื้อตั้งต้น 3 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหาร 2 ชนิด คือ glucose yeast extract (GYE) และ ethanol yeast extract (EYE) ใน 2 ภาวะ คือ ภาชนะนิ่งและภาชนะเขย่า ทำการต่อเชื้อเป็นระยะ (serial transfer) สังเกตลักษณะโคโลนีและการสร้างวุ้น พบว่า ในภาชนะเขย่าจะมีผลทำให้เชื้อมีการเจริญแบบกระจายมาก เซลล์โอสที่สร้างได้น้อยลง เมื่อแยกเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็งก็พบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างไป

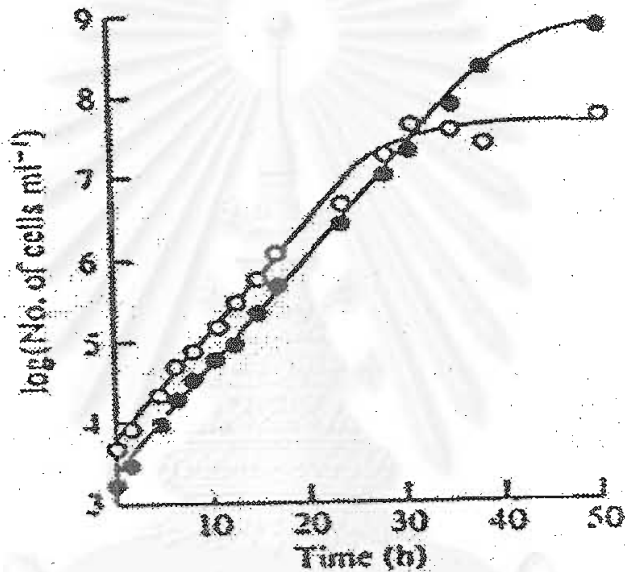
จากโคโลนีเดิมของเชื้อตั้งต้น และเมื่อเป็นการเลี้ยงในภาวะเขย่าโดยใช้อาหาร EYE ซึ่งเป็นอาหารที่เชื้อใช้ได้ไม่ดีเท่ากับ GYE ยิ่งทำให้เชื้อมีการแปรผันมากขึ้น ในภาวะนี้ ถ้าเลี้ยงด้วยอาหาร GYE ไม่พบการแปรผันของเชื้อ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร EYE พบว่าเชื้อมีการเจริญที่ไม่ค่อยดีนักสร้างวุ้นได้น้อย เมื่อแยกเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็งพบว่า มีลักษณะโคโลนีที่เปลี่ยนไปจากเดิม ปริมาณของเชื้อแปรผันที่เกิดจากเชื้อตั้งต้นแต่ละสายพันธุ์ก็มีจำนวนไม่เท่ากัน แสดงว่า อาหาร ภาวะในการเลี้ยงและสายพันธุ์ของเชื้อ มีผลต่อการแปรผันของ *Acetobacter xylinum*

Steel และ Walker (1957b) ทำการทดลองต่อโดยนำเชื้อแปรผันจากการทดลองที่ผ่านมา มาเปรียบเทียบกับสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีกับเชื้อตั้งต้น เช่น ตรวจสอบลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง พบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อแปรผันจะแตกต่างจากโคโลนีของเชื้อตั้งต้น และเมื่อระยะเวลาในการ incubate เพิ่มขึ้น ลักษณะโคโลนีของเชื้อแปรผันบางตัวก็เปลี่ยนแปลงไปด้วย เมื่อทดสอบรูปร่างลักษณะของเชื้อโดยการย้อมแกรม (Gram's stain) พบว่า เชื้อแปรผันยังคงย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเซลล์เป็นแท่ง (rod) และไม่พบการสร้างสปอร์ซึ่งเหมือนกับเชื้อตั้งต้น ทดสอบลักษณะทางชีวเคมีตามวิธีการ Frateur's test (Steel and Walker, 1957b) พบว่ามีบางลักษณะที่เชื้อแปรผันยังคงให้ผลเหมือนกับเชื้อตั้งต้น เช่น การสร้างเอนไซม์คาตาเลส การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแคลเซียมแลคเตทไปเป็นอะซิเตท แต่ก็มีบางลักษณะที่เชื้อแปรผันให้ผลต่างจากเชื้อตั้งต้น เช่น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิก การเกิดปฏิกิริยาคีโตเจนเนซิสจากกลีเซอรอล นอกจากนี้ยังมีสมบัติอื่นๆ ที่เชื้อตั้งต้นและเชื้อแปรผันมีความเหมือนและความแตกต่างกันและในทุกตัวของเชื้อแปรผันที่ได้ก็มีความแตกต่างกันด้วย

Schell และ De Ley (1962) ศึกษาการแปรผันของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย โดยดูที่ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางชีวเคมี พบว่า การแปรผันที่เกิดขึ้นกับลักษณะโคโลนีของเชื่อนั้น เป็นเหตุการณ์ที่พบได้บ่อยในเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ ในเชื้อหนึ่งสปีชีส์อาจเป็นไปได้ที่จะพบลักษณะโคโลนีได้หลายแบบ แต่เมื่อนำไปทดสอบลักษณะทางชีวเคมีแล้วพบว่า ลักษณะโคโลนีคนละแบบนั้นให้ผลทางชีวเคมีส่วนใหญ่ที่เหมือนกัน มีสมบัติที่แตกต่างกันบ้างเพียงหนึ่งหรือสองลักษณะเท่านั้น

Valla และ Kjosbakken (1982) ศึกษาถึงการเกิดเชื้อแปรผันที่ไม่สร้างเซลล์ูโลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* โดยเชื้อแปรผันนี้ได้ทั้งจากการเลี้ยงตามวิธีของ Schramm และ Hestrin (1954) ซึ่งทำให้ได้เชื้อแปรผันที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous mutation) และจากการใช้สารเคมีและแสงยูวีในการสร้างเชื้อแปรผัน จากการทดลองเชื้อแปรผันที่เกิดขึ้นเองมีทั้งหมด 50 ชนิด โดยเชื้อทั้งหมดนี้สามารถเปลี่ยนกลับเป็นเชื้อที่สร้างแผ่นวุ้นได้เมื่อนำมาเลี้ยงในภาวะนิ่ง Valla และ Kjosbakken

อธิบายว่า การเลี้ยงเชื้อในภาวะเขย่าและทำการต่อเชื้อต่อไปเรื่อยๆ จะทำให้ได้เชื้อที่เกิดการแปรผันเป็น  $Cel^-$  คือ เชื้อที่ไม่มีการสร้างเซลลูโลสหรือสร้างได้น้อยลง ได้มากกว่าเชื้อปกติที่เป็น  $Cel^+$  เพราะเมื่อดูจากกราฟในรูปที่ 2.10 พบว่า เมื่อเชื้อทั้งสองชนิดมีการเจริญจนได้เซลล์ประมาณ  $10^7$  เซลล์/มิลลิลิตร เชื้อที่เป็น  $Cel^+$  ก็จะเริ่มมีการเกาะกลุ่มกันในขณะที่เชื้อที่เป็น  $Cel^-$  จะมีการเจริญแบบกระจายต่อไปทำให้มีการเพิ่มจำนวนได้อย่างคงที่และมากกว่า  $Cel^+$  เมื่อทำการต่อเชื้อ ก็จะทำให้เชื้อที่เป็น  $Cel^-$  มีโอกาสในการถูกนำไปเป็นหัวเชื้อใหม่ได้มากกว่าเชื้อที่เป็น  $Cel^+$  ซึ่งเกาะกลุ่มกันและมีเซลลูโลสหุ้มอยู่



รูปที่ 2.10 : การเจริญเติบโตของเชื้อ *Acetobacter xylinum* ชนิดที่เป็น  $Cel^+$  (wild type) และ  $Cel^-$  ในภาวะการเลี้ยงแบบเขย่า O =  $Cel^+$  (wild type) ● =  $Cel^-$

ที่มา : Valla and Kjosbakken (1982)

การทดลองเกี่ยวกับการแปรผันของ *Acetobacter xylinum* ในระยะหลังนี้จะมุ่งเน้นในเรื่องของการแปรเพื่อให้ได้เชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้มากขึ้นให้เหมาะสมกับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเป็นส่วนใหญ่ เช่นในการทดลองของ Wulf, Joris และ Vandamme (1996) ซึ่งใช้แสงยูวีในการเหนี่ยวนำให้ *Acetobacter xylinum* เกิดการแปรผัน และนำเชื้อที่ได้มาผ่านขั้นตอนการคัดเลือกเพื่อให้ได้เชื้อที่มีการผลิตคีโตกลูโคเนต (keto-gluconate) น้อยลง เนื่องจากคีโตกลูโคเนตเป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่เชื้อผลิตออกมาพร้อมๆ กับการผลิตเซลลูโลส โดยใช้สารตั้งต้นตัวเดียวกัน คือ กลูโคส ดังนั้นถ้าทำการจำกัดการผลิตคีโตกลูโคเนตได้ก็จะทำให้เชื้อมีการผลิตเซลลูโลสได้สูงขึ้น

Ishikawa และคณะ (1995) ทำการทดลองโดยใช้สารเคมีเพื่อเหนี่ยวนำให้ได้ *Acetobacter xylinum* ที่ทนต่อซัลฟาควินิดีน (sulfaguanidine: SG) ได้ ซึ่งจะส่งผลให้เชื้อผลิตเซลลูโลสได้มากขึ้น โดยอาศัยความสัมพันธ์ที่ว่า การผลิตเซลลูโลสเกิดควบคู่ไปพร้อมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้น ถ้าเซลล์เจริญเติบโตได้ดีก็就会有การผลิตเซลลูโลสได้มากด้วย โดย SG เป็นสารอะนาลอก (analog) ของพาราอะมิโนเบนโซเอท (p-aminobenzoate: PABA) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสร้างกรดโฟลิก (folic acid) ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ในการทดลองใช้ *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) เป็นสารเคมีที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแปรผัน นำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงในอาหารที่มี SG เป็นส่วนประกอบ คัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ซึ่งแสดงว่าเป็นเชื้อแปรผันที่สามารถเพิ่มการสร้าง PABA ได้เองเพื่อให้ได้กรดโฟลิกไปใช้ในการเจริญ เชื้อที่ได้เมื่อนำมาเลี้ยงในภาวะปกติที่ไม่มี SG ก็จะมีการเจริญเติบโตสูงทำให้มีการผลิตเซลลูโลสสูงไปด้วย

## 2.9 การใช้เทคนิคเรสทริกชันแฟรกเมนต์เลงธ์พอลิมอร์ฟิซึมในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรม

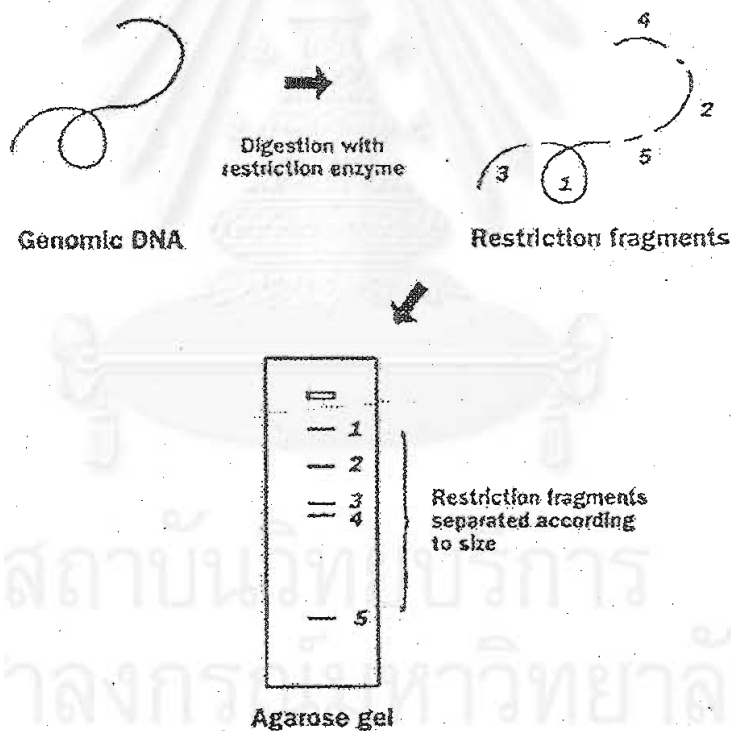
### 2.9.1 เรสทริกชันแฟรกเมนต์เลงธ์พอลิมอร์ฟิซึม

Restriction Fragment Length Polymorphism หรือ RFLP หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ (restriction enzyme)

ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตจะถูกเก็บอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลล์บางชนิดในเซลล์ เช่น ไมโทคอนเดรีย ในรูปของดีเอ็นเอ โมเลกุลของดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนี้มีความสามารถที่จะจำลองตัวเองได้อย่างถูกต้องแม่นยำและจะถ่ายทอดไปยังเซลล์ลูกเพื่อคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสิ่งแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เองหรือเหตุอื่น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ได้มีเพียงการเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัวเท่านั้นอาจมีการเปลี่ยนแปลงถึงระดับโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มมา (duplication) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของส่วนดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement หรือ inversion) หรือ มีการเปลี่ยนตำแหน่งของชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซมหรือจากต่างโครโมโซม (transposition) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ความหลากหลายนี้สามารถตรวจพบได้โดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอแล้วนำมาเปรียบเทียบกัน แต่เป็นวิธีที่ทำได้ยากและใช้เวลา

นานมาก วิธีที่ง่ายกว่า คือ นำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้นมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์นั้นดังแสดงในรูปที่ 2.11

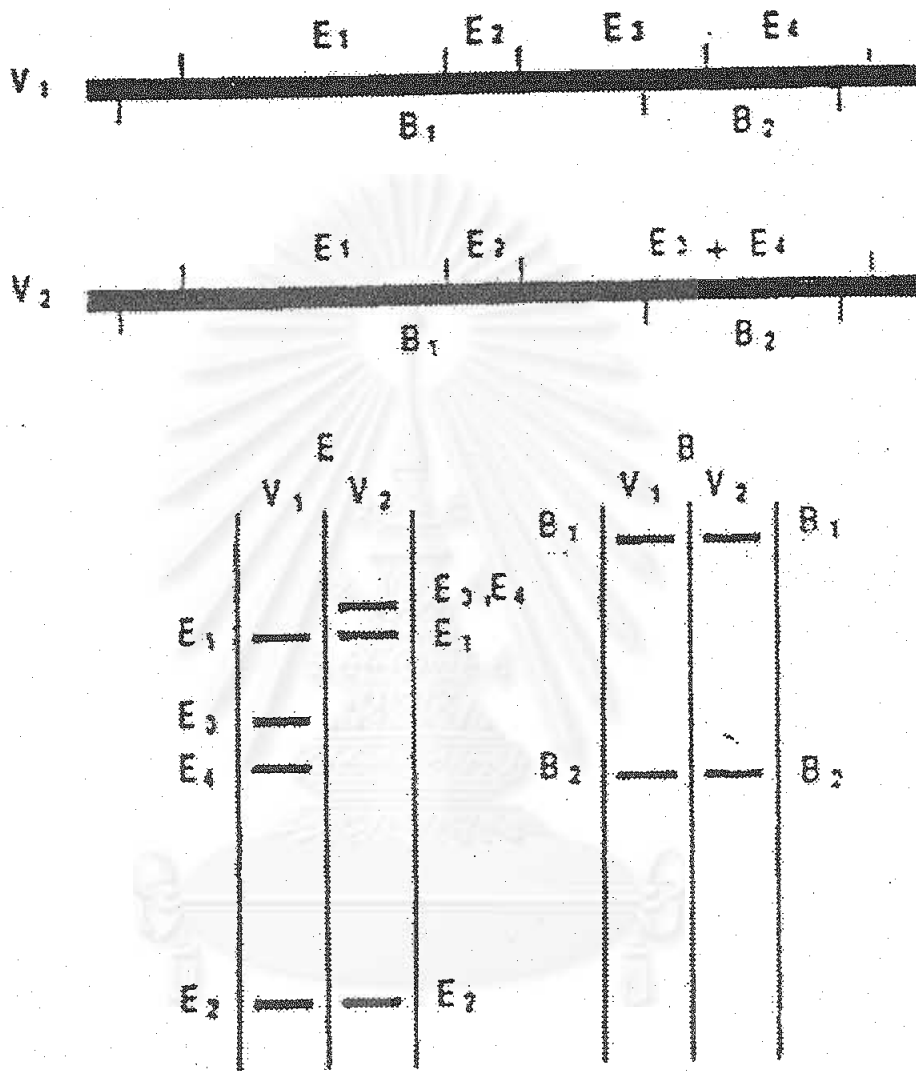
เอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรียและจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของเบสแบบจำเพาะเรียกว่า ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมาย โมเลกุลหนึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากแหล่งที่ต่างกัน และมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปหรือมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่งดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิม เรียกว่าเกิดพอลิมอร์ฟิซึมหรือมี RFLP จากตัวอย่างในรูปที่ 2.12 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ E ทำให้เกิดพอลิมอร์ฟิซึม (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2539)



รูปที่ 2.11 : การตัดดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่งโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ที่มา : สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2539)





รูปที่ 2.12 : พอลิมอร์ฟิซึมที่ตรวจพบได้จากการตัดดีเอ็นเอจากพืช V1 และ V2 ด้วยเอนไซม์ E แต่ไม่สามารถตรวจพบได้โดยใช้เอนไซม์ B  
ที่มา : สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2539)

### 2.9.2 เรสทริกชันเอนไซม์หรือเรสทริกชันเอนโดนิวคลีเอส

แบคทีเรียจำนวนมากมีระบบป้องกันตัวเองจากการบุกรุกของดีเอ็นเอแปลกปลอม โดยจะตัดดีเอ็นเอที่แปลกปลอมนั้นออกเป็นชิ้นๆ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ในขณะที่ดีเอ็นเอของตัวเซลล์เองจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมธิล (modification methylase) ที่เบสจำเพาะนั้นก่อน จึงไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ ระบบดังกล่าวนี้เรียกว่า restriction modification ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ควบคู่กัน เอนไซม์ในระบบนี้แบ่งเป็น 3 แบบ ตามลักษณะการทำงาน องค์ประกอบของหน่วยย่อยของเอนไซม์ องค์ประกอบร่วม (cofactor) ที่ใช้ และวิธีการตัดดีเอ็นเอ

แบบที่ 1 (Type I) เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลซับซ้อน ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ 3 ชนิด สามารถตัดดีเอ็นเอ (nuclease) และเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมธิลเข้าไปที่เบสบางเบส (methylase) ได้ในขณะเดียวกัน เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำที่จำเพาะ แต่จะตัดสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่ไม่เจาะจงห่างออกไป 400-7,000 คู่เบส การตัดดีเอ็นเอต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน ( $Mg^{2+}$  ion) ATP และ S-adenosylmethionine (SAM) ขณะที่เกิดการตัดสายดีเอ็นเอให้ขาด จะมีการสลาย ATP ควบคู่ไปด้วย หลังจากนั้นเอนไซม์จะหมดคุณสมบัติที่จะตัดดีเอ็นเอ แต่ยังคงมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่สลาย ATP (ATPase) ต่อไปได้อีก นอกจากนี้เอนไซม์ในแบบที่ 1 นี้จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำด้วย

แบบที่ 2 (Type II) เป็นเอนไซม์ที่ใช้มากในการตัดต่อยีน เนื่องจากโมเลกุลไม่ซับซ้อน ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์เพียงชนิดเดียว การตัดดีเอ็นเอจะเกิดที่ตำแหน่งเฉพาะในบริเวณจดจำหรือที่จุดใกล้เคียงกับบริเวณจดจำ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอนและในปฏิกิริยาต้องการเฉพาะแมกนีเซียมไอออนเท่านั้น มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงอย่างเดียว การเติมหมู่เมธิลให้กับเบสอาศัยต้องเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง

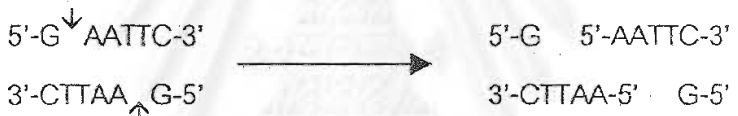
แบบที่ 3 (Type III) ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ 2 ชนิด มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะและเติมหมู่เมธิลในขณะเดียวกัน การตัดดีเอ็นเอจะเกิดห่างจากบริเวณจดจำประมาณ 25-27 คู่เบส ในปฏิกิริยาต้องมีแมกนีเซียมไอออนและ ATP โดยไม่จำเป็นต้องมี S-adenosylmethionine แต่ถ้ามีจะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และเอนไซม์จะสามารถเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งเฉพาะได้

เอนไซม์แบบที่ 1 และแบบที่ 3 จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดไม่แน่นอนและปฏิกิริยามีการแข่งขันกันว่าจะเกิดการตัดดีเอ็นเอหรือเติมหมู่เมธิล จึงไม่นิยมใช้ในการโคลนยีน

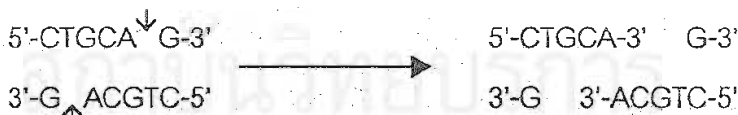
เอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 2 แยกได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ปัจจุบันพบแล้วกว่า 400 ชนิด การเรียกชื่อเอนไซม์ใช้ระบบอักษร 3 ตัว พิมพ์ตัวเอน ตัวแรกเป็นตัวพิมพ์ใหญ่อักษรแรกของชื่อจีนส์ ตัวที่ 2 และ 3 เป็นตัวพิมพ์เล็กอักษรแรกของชื่อสปีชีส์ของแบคทีเรียที่แยกเอนไซม์นั้นได้ ถ้ามีชื่อหรือรหัสของสายพันธุ์ก็ใส่ตามมาและสุดท้ายเป็นเลขโรมันบอกลำดับของเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรียดังกล่าว เช่น

<i>EcoRI</i>	มาจาก	<i>Escherichia coli</i> RY13	แยกได้เป็นชนิดแรก
<i>HaeIII</i>	มาจาก	<i>Haemophilus aegyptius</i>	แยกได้เป็นชนิดที่ 3
<i>PstI</i>	มาจาก	<i>Providencia stuartii</i>	แยกได้เป็นชนิดแรก

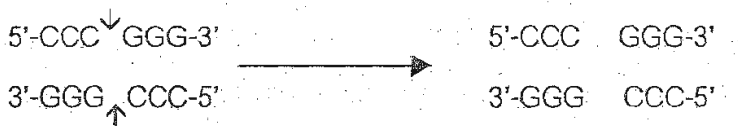
เอนไซม์จะตัดดีเอ็นเอทั้งสองสายให้ปลายที่เป็น 5'-phosphate สายหนึ่ง และ 3'-hydroxyl ในอีกสายหนึ่ง บริเวณจดจำของเอนไซม์ประกอบด้วยเบส 4 คู่ หรือ 6 คู่ หรือมากกว่านี้ โดยที่ลำดับเบสที่บริเวณจดจำมักจะมีการเรียงตัวของเบสเหมือนกันอยู่ตรงกันข้ามของ 2 สาย และมีแกนสมมาตรอยู่กึ่งกลาง (axis of symmetry) เรียกว่า palindromic เช่น *EcoRI* มีบริเวณจดจำและ จุดตัดเป็น



เมื่อตัดดีเอ็นเอให้ขาดจากกันแล้วขึ้นดีเอ็นเอทั้งสองจะมีปลายที่ยาวไม่เท่ากัน โดยเบสที่ปลายดังกล่าวอาจกลับมาจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนได้อีกเพราะมีเบสที่เป็นคู่สมกัน เรียกว่า ปลายเหนียว (cohesive end หรือ sticky end) ถ้าดีเอ็นเอที่ตัดได้มีปลาย 5' ที่ยาวกว่า 3' เช่น ในกรณีของ *EcoRI* นี้ เรียกว่า 5' protruding end ถ้าตัดแล้วได้ปลาย 3' ที่ยาวกว่าปลาย 5' ก็เรียกว่า 3' protruding end เช่น *PstI*



เอนไซม์บางชนิดจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งตรงกันทั้ง 2 สาย ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีปลายทั้งสองยาวเท่ากัน เรียกว่าปลายหยาบ (blunt end หรือ flush end) เช่น *SmaI*



เอนไซม์บางชนิดมีบริเวณจดจำที่แตกต่างกันได้บ้าง เช่น *XhoII* มีบริเวณจดจำเป็น



สมมติว่าการเรียงตัวของเบสภายในสายของดีเอ็นเอเป็นแบบสุ่ม โอกาสที่จะพบบริเวณจดจำของเอนไซม์ที่มี 4 คู่เบสจะเป็น 1 ครั้งใน  $4^4 = 256$  คู่เบส ส่วนพวกที่มีบริเวณจดจำเป็น 6 คู่เบส มีโอกาสพบ 1 ครั้งในทุกๆ  $4^6 = 4,096$  คู่เบส

ปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยทั่วไปจะมีทรिसบัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) แมกนีเซียมอิออน โซเดียมคลอไรด์ 2-mercaptoethanol pH อยู่ในช่วง 7.2-7.6 อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  แต่ก็มีบางเอนไซม์ที่ใช้อุณหภูมิหรือสภาพที่ต่างออกไป ซึ่งมักจะบอกไว้โดยบริษัทผู้ผลิต

เมื่อนำดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่งมาตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จะได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดแน่นอนซึ่งสามารถตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอนั้นได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) ซึ่งใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ตั้งแต่ประมาณ 70 คู่เบส (3% อะกาโรส) ถึงประมาณ 80,000 คู่เบส (0.1% อะกาโรส) หรือใช้พอลิอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) ซึ่งใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจาก 6 คู่เบส (20% อะคริลาไมด์) ถึงประมาณ 1,000 คู่เบส (3% อะคริลาไมด์) ดีเอ็นเอที่แยกได้นี้มองเห็นได้โดยการย้อมเจลด้วยสารเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ซึ่งจะแทรกตัวเข้าไปในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอและเรืองแสงได้เมื่อดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2539)

### 2.9.3 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

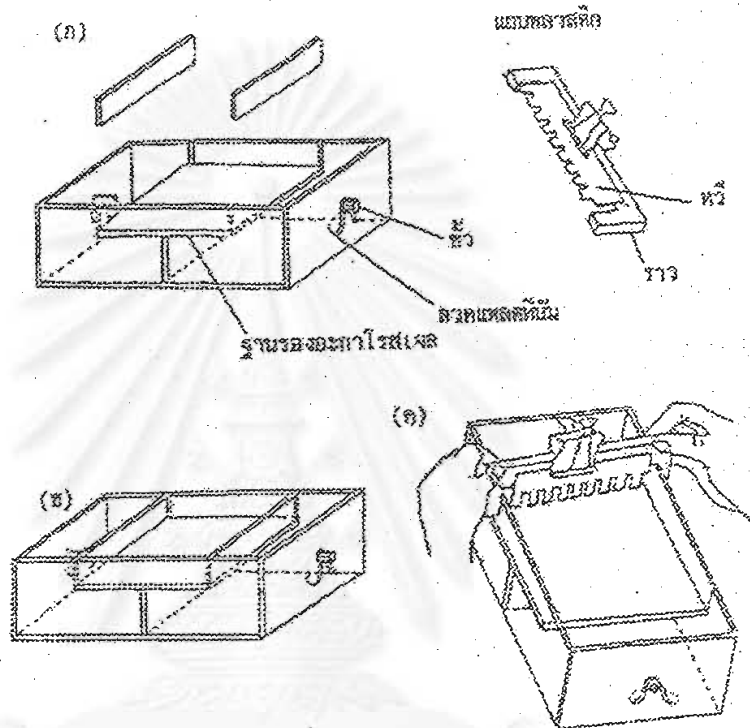
(ศิริพร สิทธิประณีต, 2531)

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้แยก วิเคราะห์ และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็วและประหยัด การตรวจหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอหลังอิเล็กโตรโฟรีซิสทำได้ค่อนข้างง่ายและมีความไวสูง ซึ่งทำโดยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้นต่ำๆ จากนั้นตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอธิเดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอ (ethidium bromide-DNA complex) โดยดูการเรืองแสง (fluorescence) เมื่อส่องอะกาโรสเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยวิธีนี้สามารถที่จะตรวจแถบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำมากขนาด 1 นาโนกรัมได้

อิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นวิธีการที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้า ออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลสารนั้นๆ ในสนามไฟฟ้า ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาดและรูปร่างของโมเลกุลสารที่ต้องการจะแยก

เจลแชมเบอร์ (gel chamber)

เจลแชมเบอร์ทำจากพลาสติก มีลักษณะเป็นกล่องสี่เหลี่ยมขนาดต่างๆ กัน ประกอบขึ้นด้วยส่วนต่างๆ ดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 : ก. ภาพแสดงส่วนประกอบต่างๆ ของเจลแชมเบอร์

ข. ภาพแสดงการประกอบแถบพลาสติก

ค. ภาพแสดงการประกอบราวและหัว

ที่มา : ศิริพร สิทธิประณีต (2531)

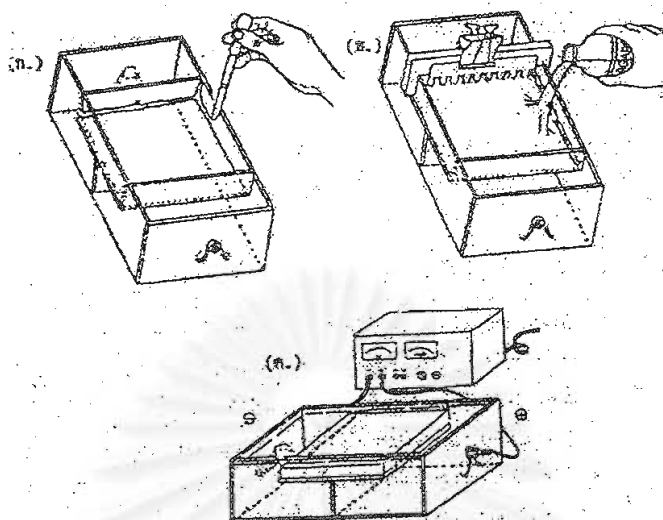
### บัฟเฟอร์ (buffer)

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสมักจะเตรียมในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าที่จะใช้จริง 10 เท่าขึ้นไป เมื่อต้องการใช้จึงจะนำมาทำให้เจือจางลง Tris-borate (TB) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุ (capacity) สูง แถบดีเอ็นเอที่แยกได้จะเล็กและคมชัด เก็บได้นานที่อุณหภูมิห้องโดยไม่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในงานประจำโดยทั่วไป

### การเตรียมอะกาโรสเจล

อะกาโรสเจลที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสมักจะมี ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.5-1.8% เตรียมโดยเติมผงอะกาโรสลงในบัฟเฟอร์ นำไปต้มในอ่างน้ำจนเดือด ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายอะกาโรสเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ  $50^{\circ}\text{C}$  จึงนำไปเทในเจลแชนเบอร์ ก่อนเทเจลลงในแชนเบอร์ต้องทำการเตรียมแชนเบอร์โดยใส่แถบพลาสติกปิดด้านปลายเปิดทั้งสองของฐานรองเจล ยาขอบรอบๆ บริเวณที่จะเทเจลด้วยเจลจำนวนน้อย แล้วทิ้งให้เจลแข็งตัว ใส่หวีโดยให้ปลายซี่หวีสูงจากฐานประมาณ 2 มิลลิเมตร แล้วจึงเทสารละลายอะกาโรสที่อุ่นลงไปให้มีความสูงประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีและแถบพลาสติกออกจากแชนเบอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.14 ก่อนที่จะหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอลงในหลุมที่เตรียมไว้ให้แท็บฟเฟอร์ลงไปให้ท่วมเจลสูงประมาณ 1-3 มิลลิเมตร

ตัวอย่างดีเอ็นเอจะต้องมีการผสมกับสีติดตาม (tracking dye) เพื่อกันไม่ให้ตัวอย่างดีเอ็นเอพุ่งขึ้นมาและเพื่อติดตามการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ สีติดตามมักจะเตรียมอยู่ในรูปสารละลายที่เข้มข้นประมาณ 6 เท่า เมื่อต้องการใช้จะผสมกับสารตัวอย่างดีเอ็นเอในอัตราส่วน 1:5 แล้วจึงนำไปหยอดในหลุมบนอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้โดยใช้ไมโครปิเปต ปริมาณของดีเอ็นเอที่จะใช้แยกไม่ควรจะต่ำกว่า 50 นาโนกรัมต่อ 1 แถบ จึงจะเห็นแถบเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตได้ชัดเจนด้วยตาเปล่าหลังย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แต่ปริมาณที่ใช้อาจลดลงเป็น 1-10 นาโนกรัมต่อ 1 แถบ เมื่อตรวจแถบของดีเอ็นเอโดยการถ่ายรูป ถ้าใส่ดีเอ็นเอต่อหนึ่งแถบบากเกินไป (>300 นาโนกรัม) แถบดีเอ็นเอที่ได้จะไม่คมชัดและเกิดหาง (tailing)



รูปที่ 2.14 : การเตรียมแชมเบอร์และการทออะกาโรสเจลลงในแชมเบอร์  
ที่มา : ศิริพร สิทธิประณีต (2531)

#### การย้อมดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

การตรวจหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอหลังอิเล็กโตรโฟรีซิสจะทำการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปจับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอเกลียวคู่โดยการอินเตอร์คาเลต (intercalate) ในทางปฏิบัติการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์จะทำโดยแช่อะกาโรสเจลลงในเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5-1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 15-60 นาที ขึ้นกับความเข้มข้นของเจลที่ใช้ ถ้าเจลมีความเข้มข้นต่ำกว่า 1% ใช้เวลาเพียง 15 นาทีก็เพียงพอ แต่ถ้าความเข้มข้นของเจลสูงกว่า 1% ต้องใช้เวลา 30-60 นาทีจึงจะเพียงพอ หลังย้อมเสร็จเรียบร้อยแล้วต้องล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเพื่อขจัดเอธิเดียมโบรไมด์ที่ไม่ได้จับกับดีเอ็นเอออก

การตรวจแถบดีเอ็นเอหลังย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์จะทำได้โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่นต่ำๆ สองอะกาโรสเจล สารเชิงซ้อนของเอธิเดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอมีคุณสมบัติดูดแสงที่ความยาวคลื่น 300 และ 360 นาโนเมตร และปล่อยแสงวาบสีส้มออกมาที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร เนื่องจากการจับระหว่างเอธิเดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอเป็นการจับที่ไม่ถาวร ดังนั้นหลังจากย้อมเจลแล้วจะต้องเก็บผลการทดลองที่ต้องการในรูปของภาพถ่าย ในการถ่ายภาพใช้กล้องธรรมดาหรือกล้องไพราลอยด์ก็ได้ ส่วนฟิล์มที่ใช้กับกล้องธรรมดานั้นต้องเป็นฟิล์มที่มีความไวแสงสูง การถ่ายภาพมักทำโดยใช้ฟิลเตอร์ (filter) สีแดงหรือสีส้มช่วย

### บทที่ 3

## การทดลอง

### 3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

*Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 893 TISTR 975 และ TISTR 1037 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ซึ่งเป็นเชื้อที่ผ่านกระบวนการไลโอไฟไลซ์ ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก 1.1) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการทดลอง

### 3.2 วัตถุดิบ

น้ำมะพร้าวแก่ สด นำมากรอง ต้มให้เดือดและทิ้งไว้ให้เย็น ตักไขมันที่ลอยหน้าออก ปรับให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดเป็น 4°Brix ด้วยน้ำต้มสุกหรือน้ำตาลทราย บรรจุขวด แช่เย็นที่ -4°C จนกว่าจะนำมาใช้

### 3.3 สารเคมีและอุปกรณ์

- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Ammonium dihydrogenphosphate)	AR Grade
แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate)	AR Grade
กรดอะซิติก (Acetic acid)	AR Grade
ผงวุ้น (Agar powder)	Merck
ผงสกัดยีสต์ (Yeast extract)	Merck
เปปโตเน (Peptone)	Difco
กลีเซอรอล (Glycerol)	AR Grade
กลูโคส (Glucose)	AR Grade
ซูโครส (Sucrose)	AR Grade
แมนนิทอล (Mannitol)	AR Grade



เอทานอล (Ethanol)	AR Grade
ฟรุคโตส (Fructose)	AR Grade
กาแลคโตส (Galactose)	AR Grade
มอลโตส (Maltose)	AR Grade
ซอร์บิทอล (Sorbitol)	AR Grade
ไซโลส (Xylose)	AR Grade
เมทานอล (Methanol)	AR Grade
แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate)	AR Grade
โบรโมครีซอลเพอร์เพิล (Bromocresol purple)	AR Grade
เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)	The East Asiatic (Thailand) Public Co.,LTD.

- สารเคมีที่ใช้ทดสอบลักษณะของเชื้อ

คริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet)	AR Grade
แอมโมเนียมออกซาเลต (Ammonium oxalate)	AR Grade
ไอโอดีน (Iodine)	AR Grade
โปแตสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide)	AR Grade
แซฟฟรานิน (Saffranin)	AR Grade
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)	AR Grade
คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate)	AR Grade
โซเดียมโปแตสเซียมทาทเรต (Sodium potassium tartrate)	AR Grade
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	AR Grade
โปแตสเซียมไฮโดรเจนพาทาลเต (Potassium hydrogen pathalate)	AR Grade
ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalene)	AR Grade
ฟีนอล (Phenol)	AR Grade
กรดซัลฟูริก (Sulphuric acid)	AR Grade

- สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ

Tris base	Molecular Grade
กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)	Molecular Grade
ไดโซเดียมเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิเตท (EDTA)	Molecular Grade
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	Molecular Grade
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)	Molecular Grade
ซูโครส (Sucrose)	Molecular Grade
โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate)	Molecular Grade
กรดอะซิติก (Acetic acid)	Molecular Grade
Rnase	Molecular Grade
ไลโซไซม์ (Lysozyme)	Molecular Grade
โพรเนส (Pronase)	Molecular Grade
โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (Sodium dodesyl sulfate)	Molecular Grade
กรดบอริก (Boric acid)	Molecular Grade
บรอมฟีนอลบลู (Bromphenol blue)	Molecular Grade
ไฟคอลล์ 400 (Ficoll 400)	Molecular Grade
เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide)	Molecular Grade
อะกาโรสเจล (Agarose gel)	Molecular Grade
Absolute ethanol	Molecular Grade

- เรสทริกชันเอนไซม์

<i>Bam</i> H <b>I</b>	Biolabs Inc. (New England)
<i>Eco</i> R <b>I</b>	Biolabs Inc. (New England)
<i>Hind</i> <b>III</b>	Biolabs Inc. (New England)
<i>Kpn</i> <b>I</b>	Biolabs Inc. (New England)
<i>Nde</i> <b>I</b>	Biolabs Inc. (New England)
<i>Pvu</i> <b>II</b>	Biolabs Inc. (New England)
<i>Sa</i> <b>I</b>	Biolabs Inc. (New England)
<i>Xba</i> <b>I</b>	Biolabs Inc. (New England)

## - อุปกรณ์

Hand refractometer

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) SCHOTT model CG 840

เครื่องชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง Sartorius

เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) LAB-LINE Instruments, Inc.

หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) TOMY model SS-320 และ SANYO Labo

ตู้อบลมร้อน (อุณหภูมิ 150°C) WTB binder

ตู้อบลมร้อน (อุณหภูมิ 105°C) PROLABO

ตู้อบเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) United Instrument Co.,LTD. และ  
Haraeus Instruments

ตู้อบเชื้อควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า LAB-Line

ตู้ไหลเชื้อ (Laminar Flow Cabinet) ISSCO model BVT-123

กล้องจุลทรรศน์ Olympus Optical Co.,LTD.  
model CH 30 RF 200เครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) Hettich model EBA 12  
KOKUSAN H-103N series  
LABQUIP 1000 seriesเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Milton Roy model Spectronic G01  
(Spectrophotometer)

เครื่องต่อชุดอิเล็กทรอนิกส์ Bio RAD model PowerPAC 300

ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -70°C BARA Laborator Co.,LTD.

เครื่องฉายแสงยูวีพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ LKB Bromma model 2011 Macrovue  
Transilluminator

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรมของ *Acetobacter* sp.

โดย streak *Acetobacter* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก 1.2) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี ย้อมแกรม ส่องดูรูปร่างและการติดสีของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

#### 3.4.2 ศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของ *Acetobacter* sp.

- การสร้างเอนไซม์คาตาเลส (Komagata, 1975) (ภาคผนวก ก 2.2) โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง GYPG (ภาคผนวก ก 1.3)
- การเกิดปฏิกิริยาคีโตเจนเนซิสจากกลีเซอรอล (Asai, Iizuka, and Komagata, 1964) (ภาคผนวก ก 2.3) โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง GGY (ภาคผนวก ก 1.6)
- การใช้แมนนิทอล (Asai et al., 1964) โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง MYP (ภาคผนวก ก 1.4) และอาหารแข็ง MGYG (ภาคผนวก ก 1.5)
- การเจริญและการเกิด clear zone บนอาหาร GYPG (Asai et al., 1964) (ภาคผนวก ก 1.3)
- การสร้างกรดและเซลล์ูโลสจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (Asai et al., 1964) โดยเลี้ยงในอาหารเหลว CBY (ภาคผนวก ก 1.7)

#### 3.4.3 ศึกษาการสร้างวุ้นเซลล์ูโลสของ *Acetobacter* sp.

โดย streak *Acetobacter* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน เลือกลง 1 โคโลนีใส่ในหลอดแก้วที่มีอาหารเหลวน้ำมะพร้าว 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายใส่ฟลาสก์ที่มีอาหารเหลวน้ำมะพร้าว 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design ทดลอง 5 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ค่าต่างๆ ที่ทำการตรวจวัด มีดังนี้

- วัดความหนาแน่นที่ได้โดยใช้ Vernier Caliper เฉลี่ยจาก 3 จุด
- ชั่งน้ำหนักเปียกของแผ่นวุ้น หลังจากวางแผ่นวุ้นบนตะแกรงเพื่อสะเด็ดน้ำเป็นเวลา 5 นาที
- ชั่งน้ำหนักแห้งของแผ่นวุ้น (ภาคผนวก ข 1)
- หาปริมาณเซลลูโลสของแผ่นวุ้น (ภาคผนวก ข 1)
- วัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
- หาปริมาณกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ข 2)
- วัดปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ข 3)
- หาการผลิตเซลลูโลส โดยคำนวณจาก

$$\text{การผลิตเซลลูโลส (cellulose production)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้ง} \times 100}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ใช้}}$$

#### 3.4.4 ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ *Acetobacter* sp. โดยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

- ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจาก ณัฐพร สุนทรวิจารณ์ , 2534; สุวรรณฯ สุทธิสุนนท์, 2535 )

เลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. ในอาหารเหลว น้ำมะพร้าว 50 มิลลิลิตร ที่เติมเอนไซม์เซลลูเลส 75 ไมโครลิตร ในภาวะเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน เซลล์จะอยู่ในช่วง mid log phase ปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 4,000xg เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใส ออกแล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วย SET buffer (ภาคผนวก ค 1.5) นำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 4,000xg เป็นเวลา 20 นาที เท SET buffer ออก นำตะกอนเซลล์ไปแช่ที่อุณหภูมิ -70°C เมื่อครบ 10 นาที นำออกมาแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 65°C ทันที เติม SET buffer 2 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วปั่นให้ตะกอนเซลล์กระจายอย่างสม่ำเสมอด้วยเครื่อง vortex mixer ทำให้เซลล์แตกโดยเติม lysozyme (ภาคผนวก ค 1.9) 0.2 มิลลิลิตร ย่อย RNA ด้วยการเติมสารละลาย Rnase ที่ประกอบด้วย Rnase 5 มิลลิกรัม ใน Rnase buffer 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค 1.7) 0.1 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 15 นาที เติม SDS 25% (ภาคผนวก ค 1.11) 0.05 มิลลิลิตร กลับไปมาเบาๆ จะได้สารละลายที่มีลักษณะขุ่นหนืด นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C และกลับหลอดทุกๆ ครึ่งชั่วโมงเป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง เติมสารละลาย pronase (ภาคผนวก ค 1.10) 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 คืน เติม TEN buffer (ภาคผนวก ค 1.8) 1 มิลลิลิตร และสารละลาย chloroform:isoamyl (24:1) 2 เท่า

ของปริมาตรสารละลายทั้งหมด กลับหลอดไปมาเบาๆ 10 ครั้งก่อนที่ นำไปปั่นด้วยความเร็ว 5,000xg เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกชั้นของสารผสม ใช้ tip ปลายตัดดูดสารละลายชั้นบนแยกใส่อีกหลอด แล้วเติมสารละลาย chloroform:isoamyl (24:1) 2 เท่าของปริมาตรสารละลายทั้งหมดอีกครั้ง ทำการปั่นแยกและดูดสารละลายชั้นบนแยกใส่อีกหลอดในลักษณะเดิม เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ค 1.3) 5 มิลลาร์ 1/25 เท่าของปริมาตรสารละลายที่แยกได้ และเติม absolute ethanol 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย กลับหลอดไปมาเบาๆ จะเห็นดีเอ็นเอสายสีขาว นำไปปั่นแยกดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 10 นาที เท absolute ethanol ออก เติมเอทานอลความเข้มข้น 70% เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ ปั่นแยกอีกครั้งในลักษณะเดิมและเทเอทานอลออก ดีเอ็นเอที่ได้นำไปทำให้แห้งที่ตู้ปั๊มอุณหภูมิ 37°C จากนั้นเติม TE buffer (ภาคผนวก ค 1.12) 100 ไมโครลิตร กลับไปมา เก็บที่อุณหภูมิ 37°C 1 คืนเพื่อให้ดีเอ็นเอละลายอย่างสมบูรณ์

- การย่อยดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

เตรียม reaction mixture 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร เรสทริกชันเอนไซม์ 1 ไมโครลิตรสำหรับเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 5-10 ยูนิต ถ้าเอนไซม์มีความเข้มข้น 20 ยูนิต ใช้ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับชนิดของเอนไซม์ 2 ไมโครลิตร (ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต) น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 12 ไมโครลิตร หรือมากกว่า เพื่อปรับปริมาตรของ reaction mixture ให้เป็น 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ปั่นที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ (ภาคผนวก ค 2) 1 คืน

- การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำ reaction mixture มาเติมสีย้อม (ภาคผนวก ค 1.14) 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน load ลงในช่องของอะกาโรสเจล (ภาคผนวก ค 1.16) ที่เตรียมไว้ ต่อหัวไฟฟ้าใช้ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ สังเกตการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอโดยดูที่สีย้อม ปิดเครื่องเมื่อสีย้อมเคลื่อนที่มาเกือบสุดแผ่นอะกาโรสเจล นำแผ่นอะกาโรสเจลแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ภาคผนวก ค 1.15) ประมาณ 5 นาที เพื่อให้สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอได้เมื่อส่องด้วยแสงยูวี แช่แผ่นอะกาโรสเจลในน้ำเพื่อล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออก นำแผ่นอะกาโรสเจลที่ได้วางบนเครื่องกำเนิดแสงยูวี ถ่ายภาพดีเอ็นเอที่ได้

3.4.5 ศึกษาการเจริญเติบโตของ *Acetobacter* sp. เมื่อเลี้ยงในภาวะนิ่งและภาวะเขย่า

โดย streak *Acetobacter* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน เลือกลง 1 โคโลนีใส่ในหลอดแก้วที่มีอาหารเหลวน้ำมะพร้าว 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายใส่พลาสติกที่มีอาหารเหลวน้ำมะพร้าว 50 มิลลิลิตร เต็มเอินไซม์ เซลลูโลส 75 ไมโครลิตร (ดัดแปลงจาก Oikawa, Morino, and Ameyama, 1995) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C ในภาวะนิ่ง 1 ชุด และในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm 1 ชุด ตรวจปริมาณเชื้อทั้งหมด (total plate count) ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงการเจริญเติบโตของ *Acetobacter* sp. ทั้งในภาวะการเลี้ยงแบบนิ่งและการเลี้ยงแบบเขย่า

### 3.4.6 วิธีการเลี้ยงเชื้อและการต่อเชื้อ

วิธีการเลี้ยงเชื้อและการต่อเชื้อ มี 3 วิธี คือ

#### 3.4.6.1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ภาวะนิ่ง

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30°C ในภาวะนิ่ง ทำการต่อเชื้อโดยใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อจากพลาสติกเดิม 5 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกใหม่ทุกๆ 3 วัน ในทุกๆ ครั้งของการต่อเชื้อจะทำการวัดค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรดและปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.4.3 เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ และเมื่อทำการต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง จะนำเชื่อนั้นมา streak ลงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน เพื่อสังเกตลักษณะโคโลนีที่อาจเปลี่ยนแปลงไป และนำมาศึกษาการสร้างวุ้น โดยปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อจาก พลาสติกที่มีเชื้ออยู่ 5 มิลลิลิตร ใส่ในพลาสติกใหม่ที่มีอาหารเหลวน้ำมะพร้าว 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวัดค่าต่างๆ ตามข้อ 3.4.3

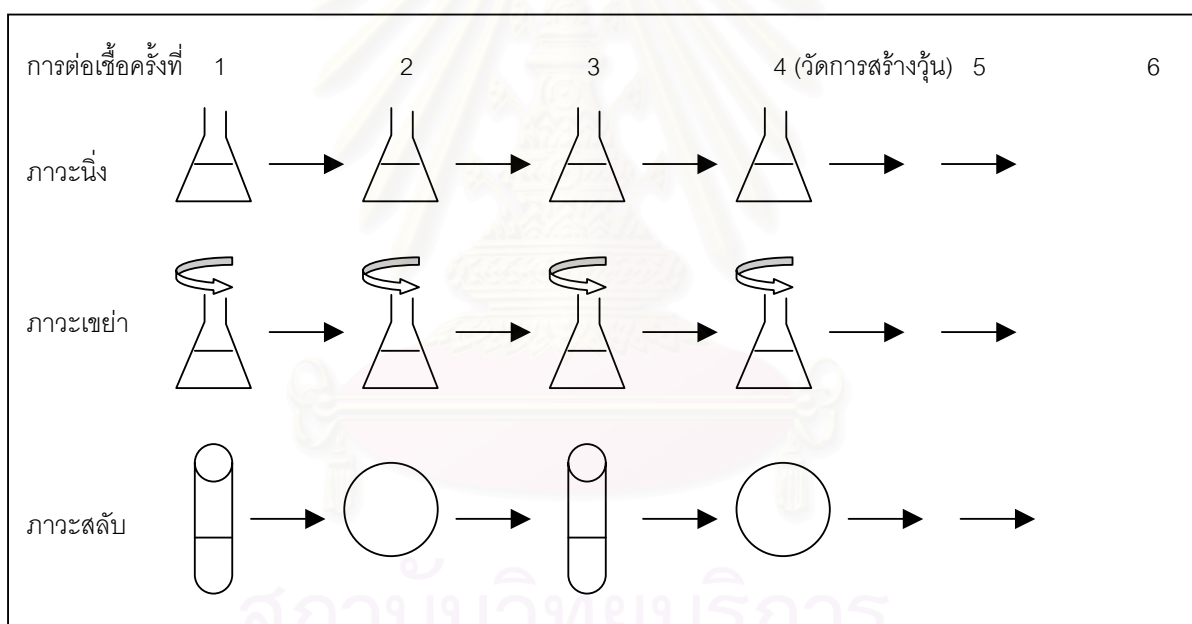
#### 3.4.6.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30°C ในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm ทำการต่อเชื้อโดยใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อจากพลาสติกเดิม 5 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกใหม่ทุกๆ 3 วัน ในทุกๆ ครั้งของการต่อเชื้อจะทำการวัดค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรดและปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.4.3 เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ และเมื่อทำการต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง จะนำเชื่อนั้นมา streak ลงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน เพื่อสังเกตลักษณะโคโลนีที่อาจเปลี่ยนแปลงไป และนำมาศึกษาการสร้างวุ้น โดยปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อจากพลาสติกที่มีเชื้ออยู่ 5 มิลลิลิตร ใส่ในพลาสติกใหม่ที่มีอาหารเหลวน้ำมะพร้าว 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวัดค่าต่างๆ ตามข้อ 3.4.3

#### 3.4.6.3 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสลัดกับอาหารแข็ง

เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน สลับกับเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วิธีนี้จะทำให้สังเกตลักษณะโคโลนีได้ทุกครั้งเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง เมื่อทำการต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง จะนำเชื้อมาศึกษาการสร้างวุ้นตามวิธีในข้อ 3.4.3

ทั้ง 3 วิธีของการเลี้ยงเชื้อวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ส่วนในขั้นตอนของการศึกษาการสร้างวุ้น เมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design ทดลอง 5 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test



รูปที่ 3.1 : ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อ 3 วิธี

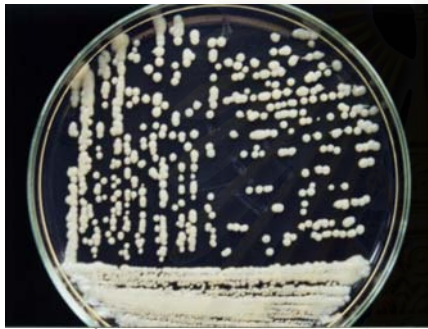


## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรมของ *Acetobacter* sp.

*Acetobacter* sp. TISTR 893 มีลักษณะโคโลนีกลม ค่อนข้างแบน ขอบเรียบ ผิวค่อนข้างด้าน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.1



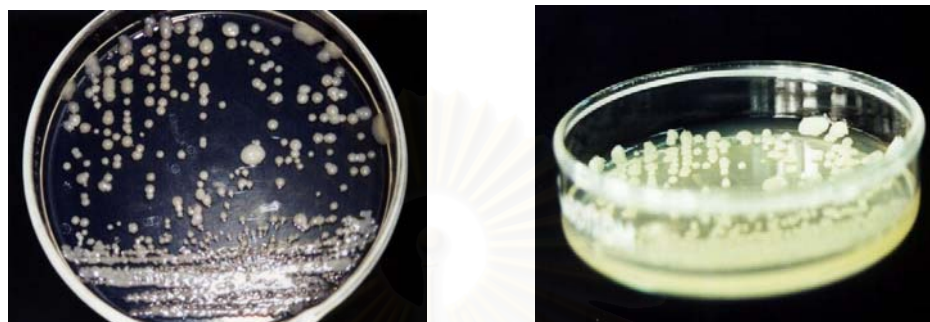
รูปที่ 4.1 : โคโลนีของ *Acetobacter* TISTR 893 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

*Acetobacter* sp. TISTR 975 โคโลนีมีลักษณะกลมมนสูง คล้ายระฆังคว่ำ ขอบเรียบ ผิวของโคโลนี ค่อนข้างด้าน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 : โคโลนีของ *Acetobacter* TISTR 975 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

*Acetobacter* sp. TISTR 1037 โคโลนีมีลักษณะกลม เรียบแบน ขอบค่อนข้างเรียบ มีความมันวาวเล็กน้อย มีจุดสีขาวเล็กๆ อยู่บริเวณกลางโคโลนี มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5-3 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 : โคโลนีของ *Acetobacter* TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

โคโลนีของ *Acetobacter* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีสีขาวค่อนข้างเหลือง และเนื่องจากทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตเซลล์ได้ ทำให้รอบโคโลนีมีเซลล์ล้นออกมาอยู่ เมื่อใช้ loop เขี่ย ทั้งโคโลนีจะหลุดติดมากับ loop เมื่อทำการย้อมเซลล์ *Acetobacter* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า *Acetobacter* sp. มีลักษณะเซลล์ยาว รี (rod shape) ย้อมติดสีแกรมลบ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ ดังแสดงในรูปที่ 4.4

รูปที่ 4.4 : ลักษณะเซลล์ของ *Acetobacter* sp. อายุ 7 วันเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์



กำลังขยาย 1,000 เท่า

#### 4.2 ลักษณะทางชีวเคมีของ *Acetobacter* sp.

ผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของ *Acetobacter* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 : ผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของ *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์

strain	TISTR 893	TISTR 975	TISTR 1037
Characteristics			
Catalase test	+	+	+
Ketogenesis from glycerol	+	+	+
Growth on :			
Glucose-mannitol agar (MGYP)	+	+	+
Mannitol agar (MYP)	+	+	+
GYPG and clear zone	+	+	+
Acid and cellulose production from :			
Glucose	+/c	+/c	+/c
Ethanol	-	-	-
Fructose	+/c	+/c	+/c
Galactose	+/c	+/c	+/c
Glycerol	-	-	+
Maltose	+/c	-/c	-/c
Mannitol	+/c	+/c	+/c
Sorbitol	c	c	c
Sucrose	+/c	+/c	+/c
Xylose	+/c	+/c	+/c

+ : positive result - : negative result or no growth

c : cellulose production

จากตาราง พบว่า *Acetobacter* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลสได้ เกิด ปฏิกริยาคีโตเจนเนซิส คือ สามารถสร้างไดไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอลได้ เจริญเติบโตบนอาหาร GYPG ได้ และสร้างกรดจากอาหาร GYPG ได้ด้วย โดยสังเกตจากการเกิด clear zone รอบโคโลนินบนอาหาร GYPG เจริญเติบโตบนอาหาร MYP และ MGYP ได้ แต่การสร้างกรดและเซลลูโลสจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ มีความแตกต่างกัน

#### 4.3 ลักษณะการสร้างวุ้นเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp.

ลักษณะการสร้างวุ้นเซลลูโลสของ *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 : ลักษณะการสร้างวุ้นของ *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

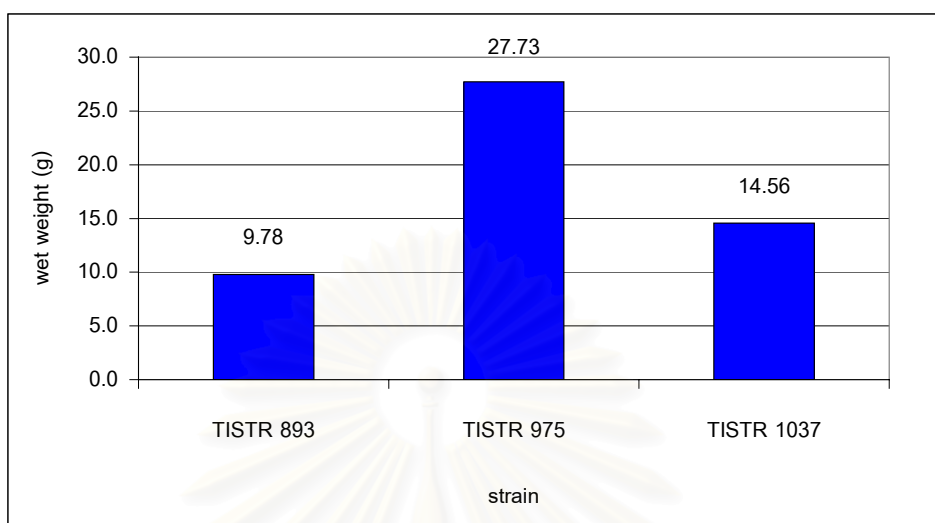
Characteristics	Strain	mean <sup>1</sup> ± SD		
		TISTR 893	TISTR 975	TISTR 1037
Thickness (cm)		0.36 <sup>a</sup> ± 0.03	1.04 <sup>c</sup> ± 0.08	0.55 <sup>b</sup> ± 0.04
Wet weight (g)		9.78 <sup>a</sup> ± 0.75	27.73 <sup>c</sup> ± 1.50	14.56 <sup>b</sup> ± 0.96
pH		3.97 <sup>b</sup> ± 0.05	3.73 <sup>a</sup> ± 0.04	3.97 <sup>b</sup> ± 0.09
Acid content (g acetic acid/100 ml media)		0.22 <sup>a</sup> ± 0.01	0.30 <sup>b</sup> ± 0.01	0.23 <sup>a</sup> ± 0.01
Cellulose content (g cellulose/100 g wet weight)		2.64 <sup>b</sup> ± 0.08	1.91 <sup>a</sup> ± 0.06	1.84 <sup>a</sup> ± 0.08
Sugar consumption (g sugar consumption/100 g total sugar)		9.43 <sup>a</sup> ± 0.35	24.51 <sup>c</sup> ± 1.08	11.52 <sup>b</sup> ± 0.71
Cellulose production (g cellulose/100 g sugar consumption)		35.27 <sup>b</sup> ± 2.88	27.88 <sup>a</sup> ± 1.39	30.10 <sup>a</sup> ± 3.12

<sup>1</sup> ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 5 ซ้ำ

<sup>a,b,c</sup> ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

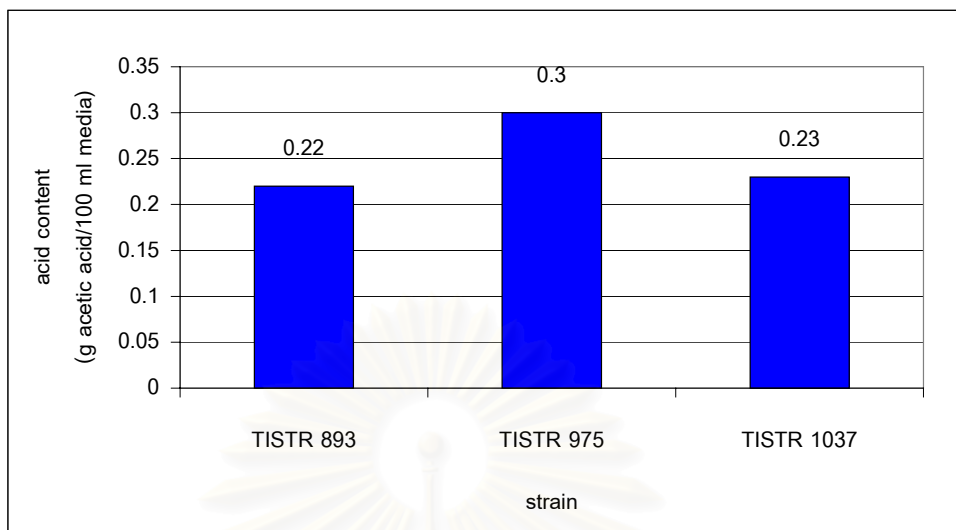
พบว่า *Acetobacter* sp. TISTR 975 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตวุ้นเซลลูโลสได้หนาที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ให้วุ้นที่มีความหนา 1.04 เซนติเมตร ให้น้ำหนักเปียก 27.73 กรัม รองลงมา คือ TISTR 1037 ให้วุ้นที่มีความหนา 0.55 เซนติเมตร ให้น้ำหนักเปียก 14.56 กรัม TISTR 893 ผลิตวุ้นที่มีความหนาน้อยที่สุด คือ 0.36 เซนติเมตร ให้น้ำหนักเปียก 9.78 กรัม น้ำหนักเปียกของแผ่นวุ้นที่ได้แสดงในรูปที่ 4.5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



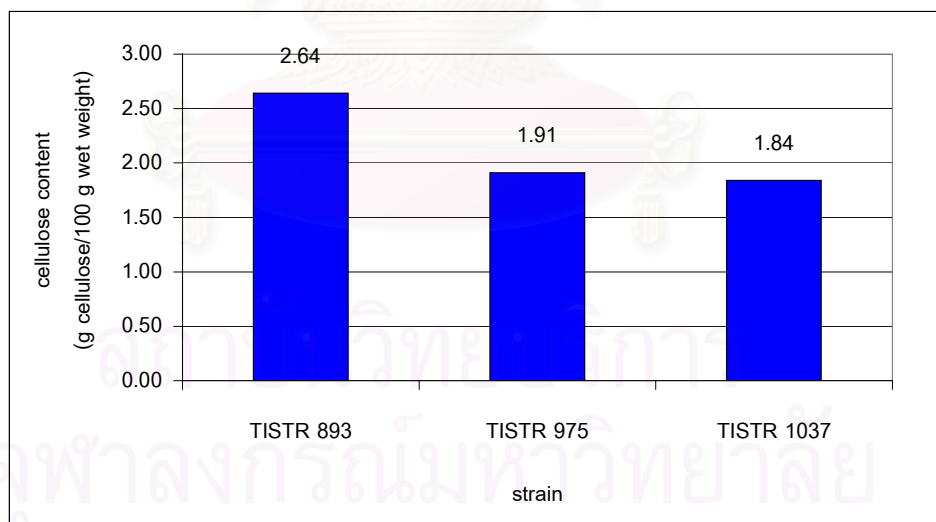
รูปที่ 4.5 : น้ำหนักเปียกของวุ้นเซลล์โลสที่ผลิตโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

TISTR 975 เป็นสายพันธุ์ที่ทำให้อาหารมีปริมาณกรดสูงที่สุด คือ 0.30 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิตร รองลงมา คือ TISTR 1037 และ TISTR 893 ซึ่งทำให้อาหารมีปริมาณกรดเท่าๆ กัน คือ 0.23 กรัม และ 0.22 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.6



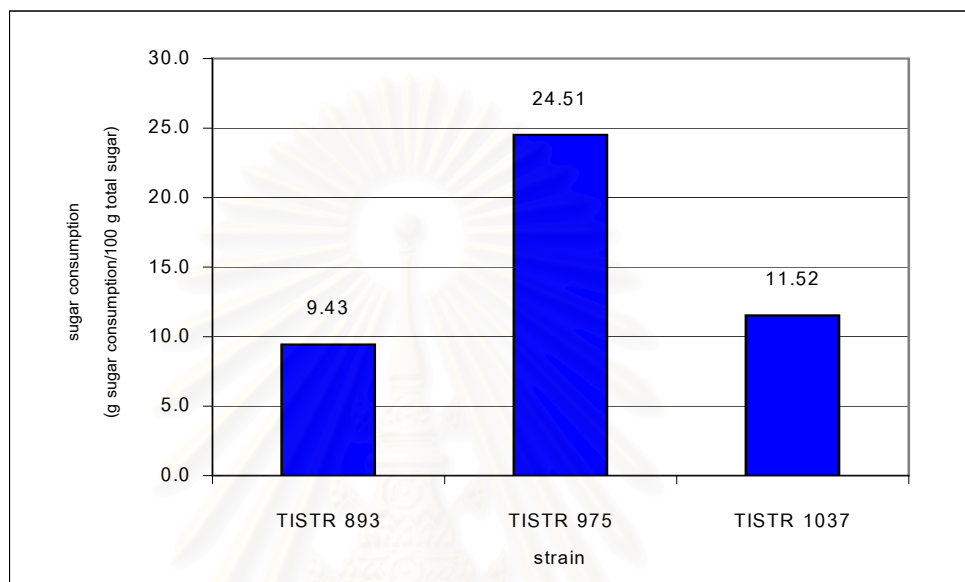
รูปที่ 4.6 : ปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

เมื่อพิจารณาปริมาณเซลลูโลสจากแผ่นวุ้นที่ได้ พบว่า TISTR 893 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด คือ 2.64 กรัมเซลลูโลสต่อ 100 กรัมน้ำหนักเปียก รองลงมา คือ TISTR 975 ให้ปริมาณเซลลูโลสเป็น 1.91 กรัมเซลลูโลสต่อ 100 กรัมน้ำหนักเปียก ส่วน TISTR 1037 ให้ปริมาณเซลลูโลสเพียง 1.84 กรัมเซลลูโลสต่อ 100 กรัมน้ำหนักเปียก ดังแสดงในรูปที่ 4.7



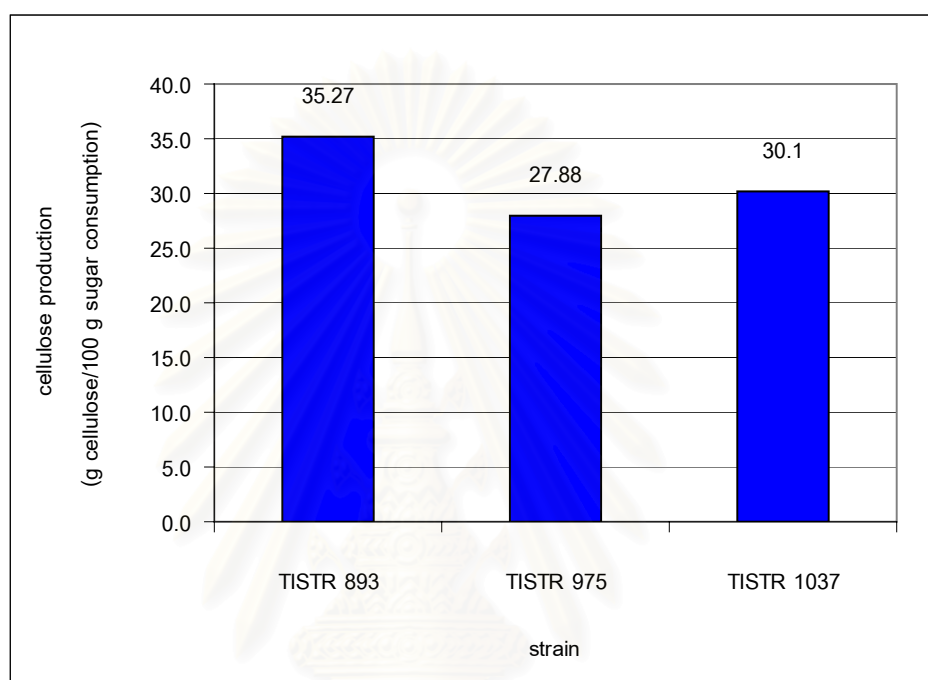
รูปที่ 4.7 : ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียกของวุ้นเซลลูโลสที่ผลิตโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่ใช้ พบว่า TISTR 975 เป็นสายพันธุ์ที่ใช้น้ำตาลในอาหารมากที่สุด คือ 24.51 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำตาลทั้งหมด รองลงมา คือ TISTR 1037 ใช้น้ำตาล 11.52 กรัม และ TISTR 893 ใช้น้ำตาล 9.43 กรัม ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 : ปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

เมื่อพิจารณาการผลิตเซลลูโลสที่ได้จึงพบว่า TISTR 893 เป็นสายพันธุ์ที่ให้การผลิตเซลลูโลสสูงที่สุด คือ 35.27 กรัมเซลลูโลสต่อ 100 กรัมน้ำตาลที่ใช้ รองลงมา คือ TISTR 1037 ให้ 30.10 กรัมเซลลูโลสต่อ 100 กรัมน้ำตาลที่ใช้ ส่วน TISTR 975 เป็นสายพันธุ์ที่ให้การผลิตเซลลูโลสต่ำที่สุด คือ 27.88 กรัมเซลลูโลสต่อ 100 กรัมน้ำตาลที่ใช้ ดังแสดงในรูปที่ 4.9

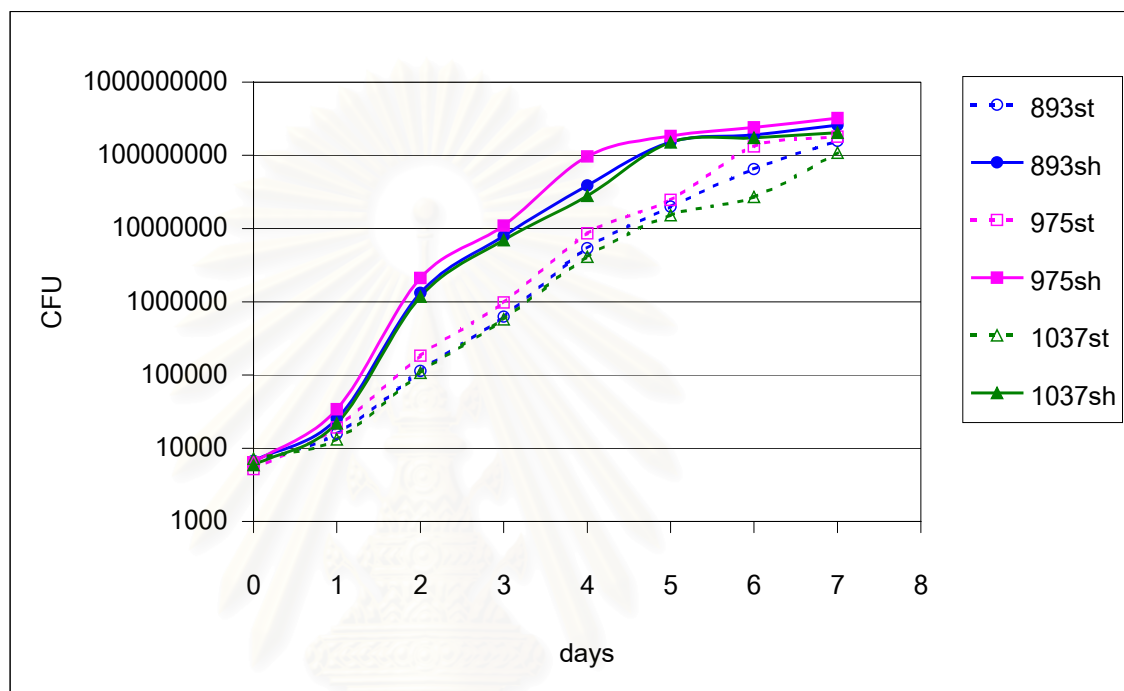


รูปที่ 4.9 : การผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน



#### 4.4 ลักษณะการเจริญเติบโตของ *Acetobacter* sp. ในภาวะนิ่งและภาวะเขย่า

เมื่อเลี้ยง *Acetobacter* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว 50 มิลลิลิตรที่ภาวะนิ่งและภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.10



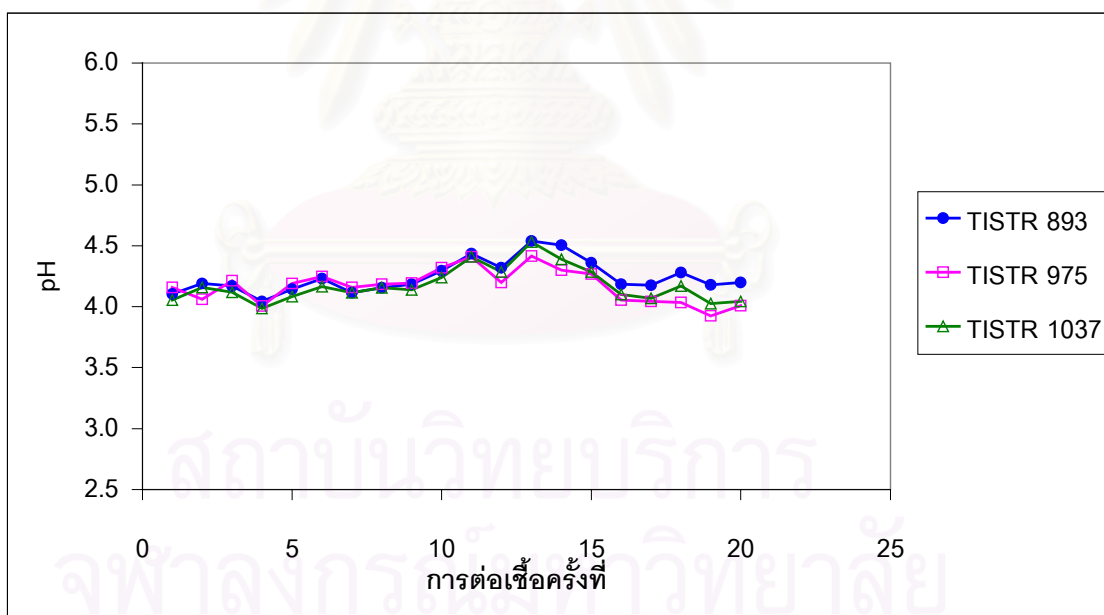
รูปที่ 4.10 : ลักษณะการเจริญเติบโตของ *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในภาชนะนิ่ง และภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 30°C (st = การเลี้ยงในภาชนะนิ่ง sh = การเลี้ยงในภาวะเขย่า)

ในภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าเชื้อจะมีปริมาณสูงกว่าการเลี้ยงแบบนิ่ง Log phase ของ *Acetobacter* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ในการเลี้ยงที่ภาวะเขย่าอยู่ในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 ส่วนภาวะ การเลี้ยงแบบนิ่ง Log phase จะอยู่ในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 6 จึงเลือกช่วงกลางของ Log phase คือวันที่ 3 ซึ่งเป็นช่วงประมาณกึ่งกลางของการเลี้ยงทั้งสองภาวะเป็นวันที่ทำการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะนิ่งและเขย่า

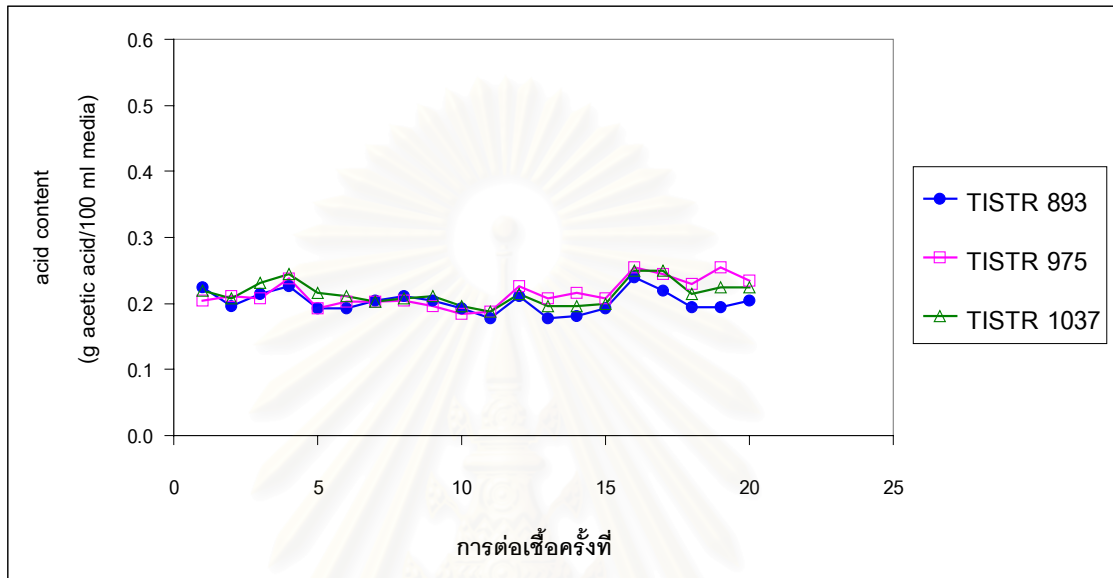
#### 4.5 ผลจากการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อ

##### 4.5.1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ภาวะนิ่ง

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่ภาวะนิ่งอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 60 วัน ต่อเชื้อทุก 3 วัน เมื่อทำการต่อเชื้อแต่ละครั้ง ได้ติดตามค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรดในอาหาร และปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.11–4.13

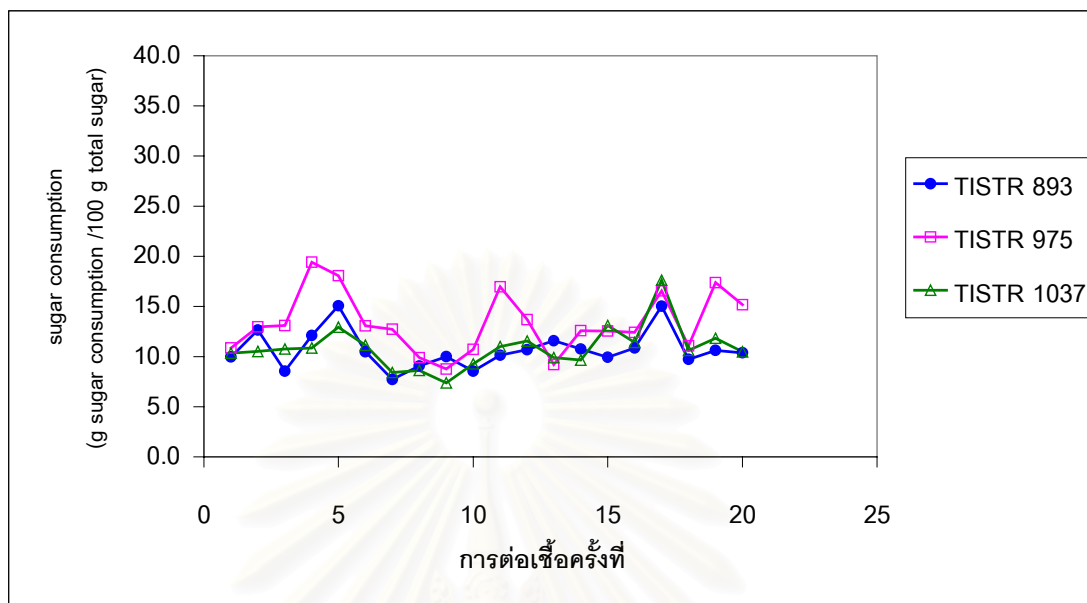


รูปที่ 4.11 : ค่า pH ของอาหารจากการเลี้ยง *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ภาวะนิ่ง



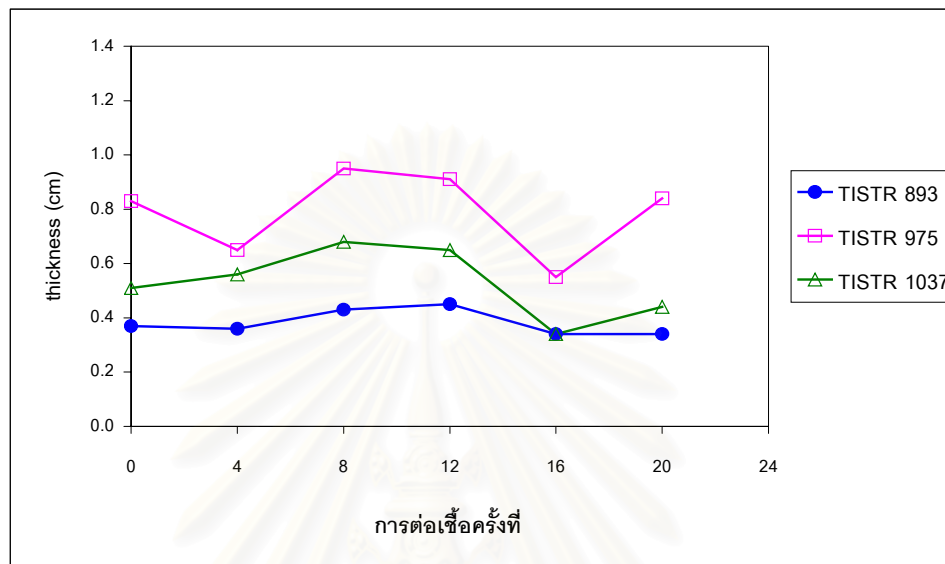
รูปที่ 4.12 : ปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ภาวะนิ่ง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

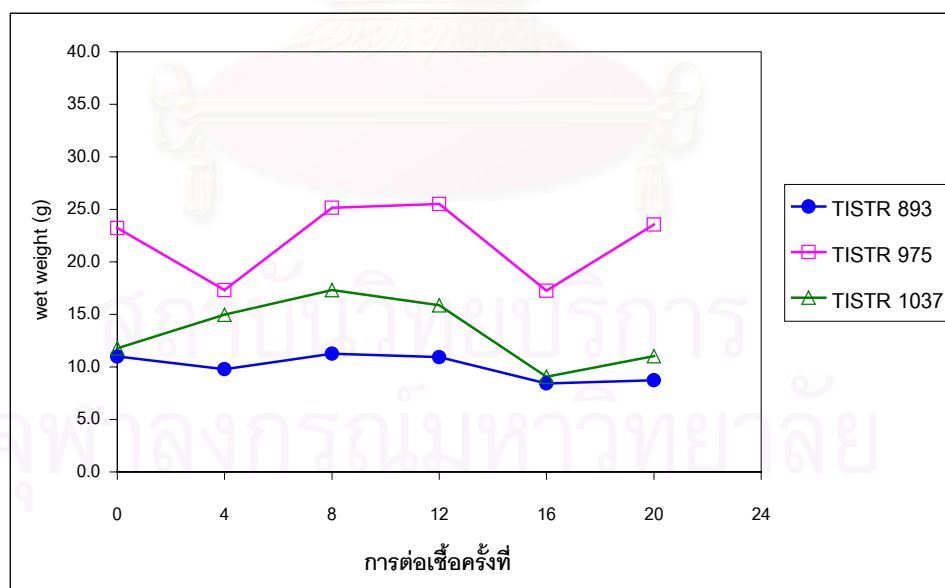


รูปที่ 4.13 : ปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ภาชนะนี้

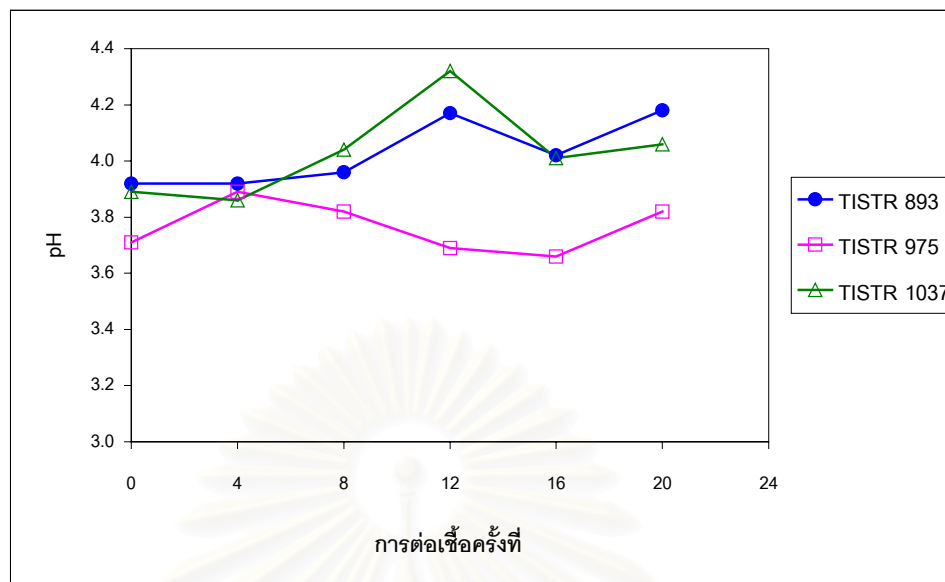
พบว่าค่า pH และปริมาณกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงในแต่ละครั้งของการเลี้ยงเชื้อค่อนข้างน้อย แต่ปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างสูง และเมื่อทำการต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง นำเชื้อมาวัดสมบัติการสร้างวุ้น ได้ผล ดังแสดงในรูปที่ 4.14-4.20



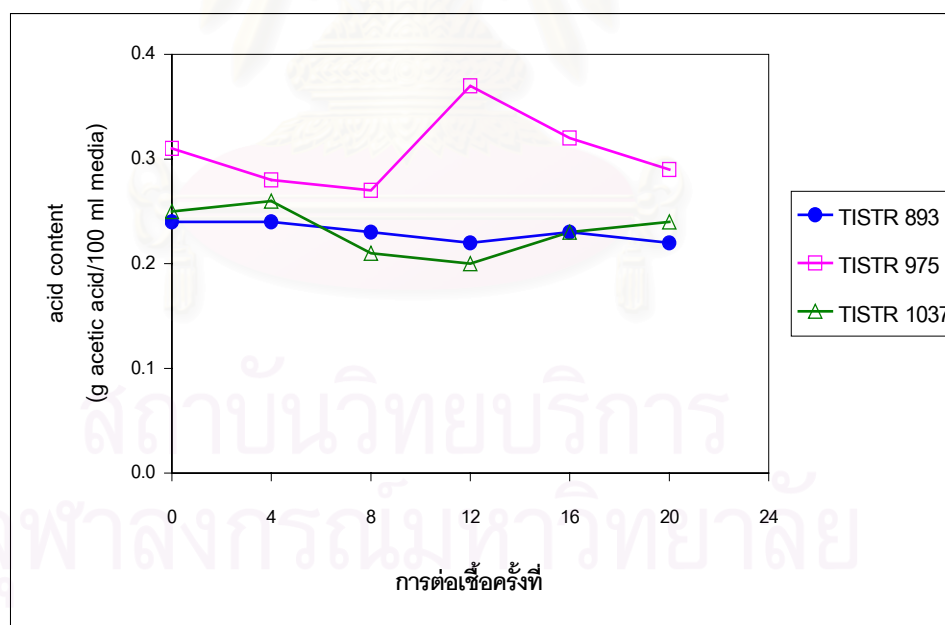
รูปที่ 4.14 : ความหนาของวุ้นเซลลูโลสที่ผลิตโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะนิ่ง



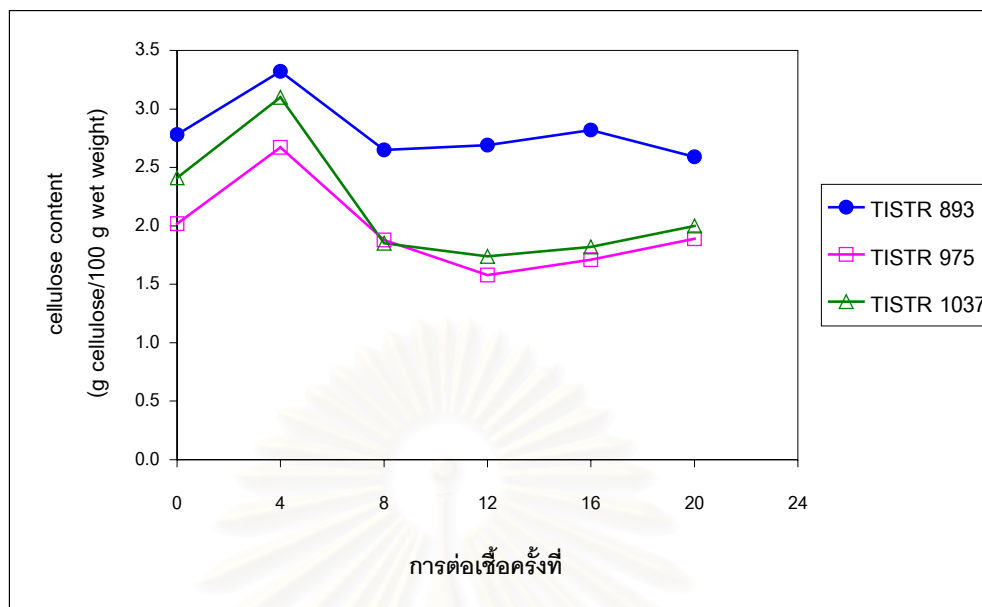
รูปที่ 4.15 : น้ำหนักเปียกของวุ้นเซลลูโลสที่ผลิตโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะนิ่ง



รูปที่ 4.16 : ค่า pH ของอาหารจากการเลี้ยง *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวที่ภาวะนิ่ง

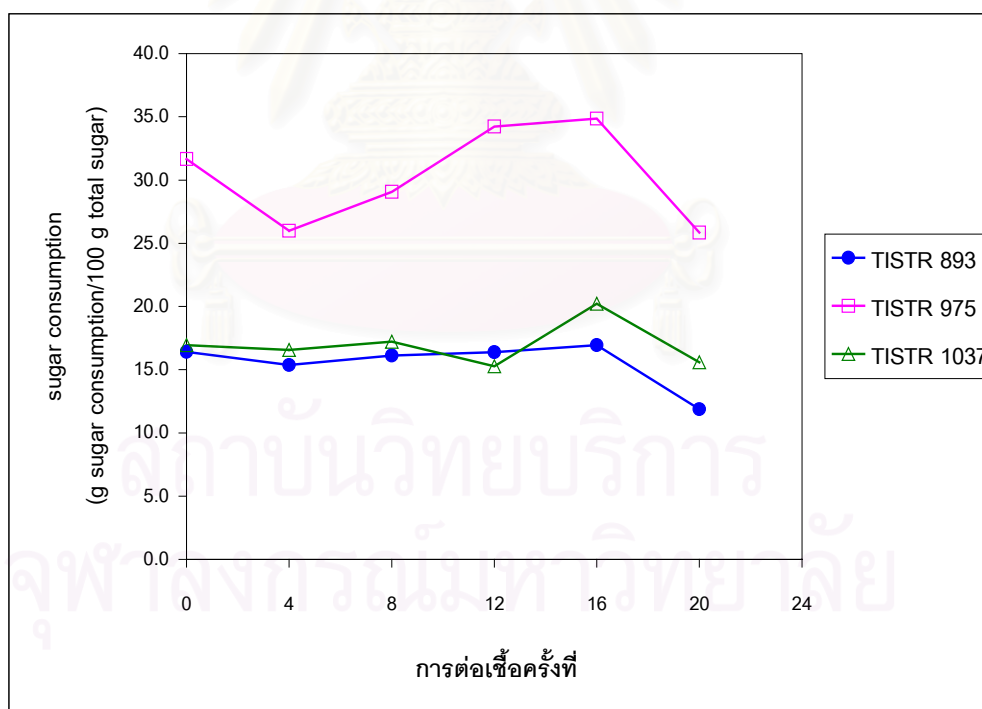


รูปที่ 4.17 : ปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะนิ่ง

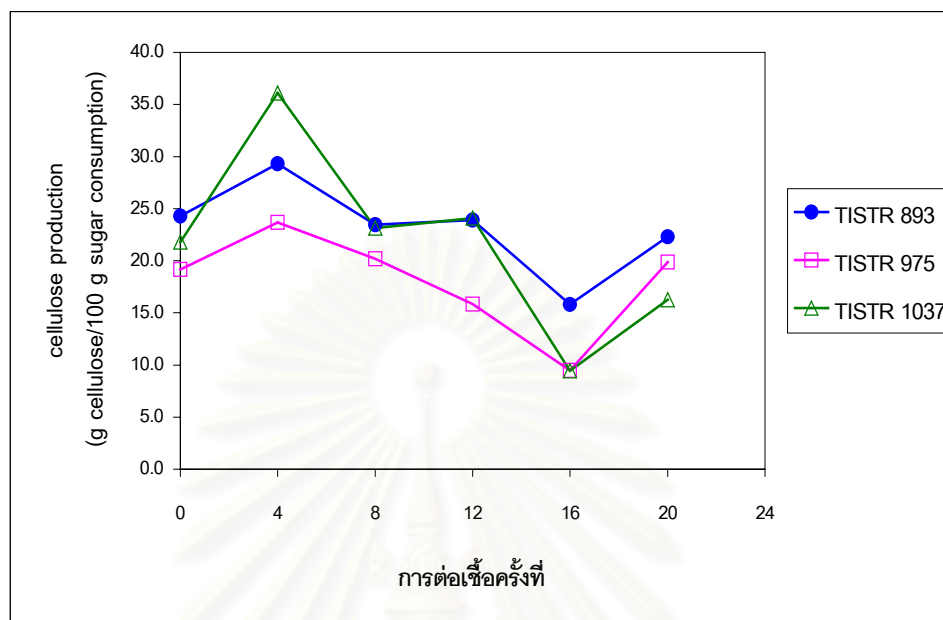


รูปที่ 4.18 : ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียกของวุ้นเซลลูโลสที่ผลิตโดย *Acetobacter* sp.

3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาชนะนี้



รูปที่ 4.19 : ปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาชนะนี้



รูปที่ 4.20 : การผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะนิ่ง

เมื่อนำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มาวัดการสร้างวุ้นหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งพบว่า *Acetobacter* sp. TISTR 975 ยังคงเป็นสายพันธุ์ที่มีการสร้างแผ่นวุ้นได้หนาที่สุด ให้น้ำหนักเปียกสูงสุด ผลิตรวดและใช้น้ำตาลมากที่สุดด้วย แต่ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ยังคงต่ำที่สุดเช่นเดิม

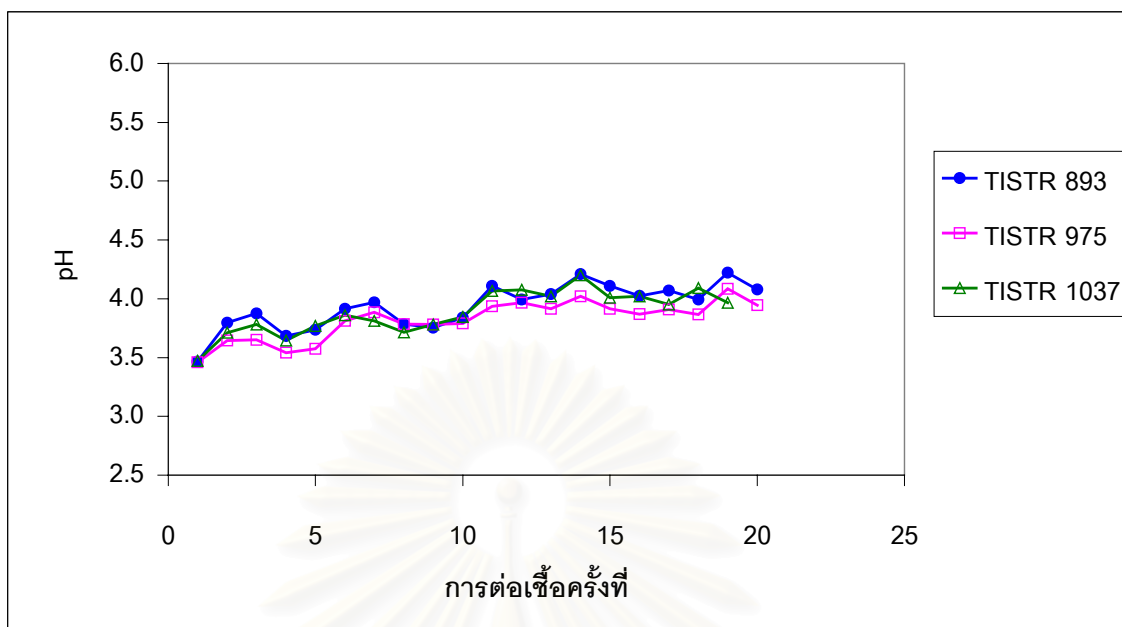
จากการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อในอาหารเหลวที่ภาวะนิ่งทำให้เกิดเชื้อที่มีการแปรผัน

1 สายพันธุ์ ตั้งชื่อเป็น 975B เนื่องจากเกิดการแปรผันมาจาก *Acetobacter* sp. TISTR 975 พบเมื่อทำการ streak ลงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าวจากการต่อเชื้อครั้งที่ 16

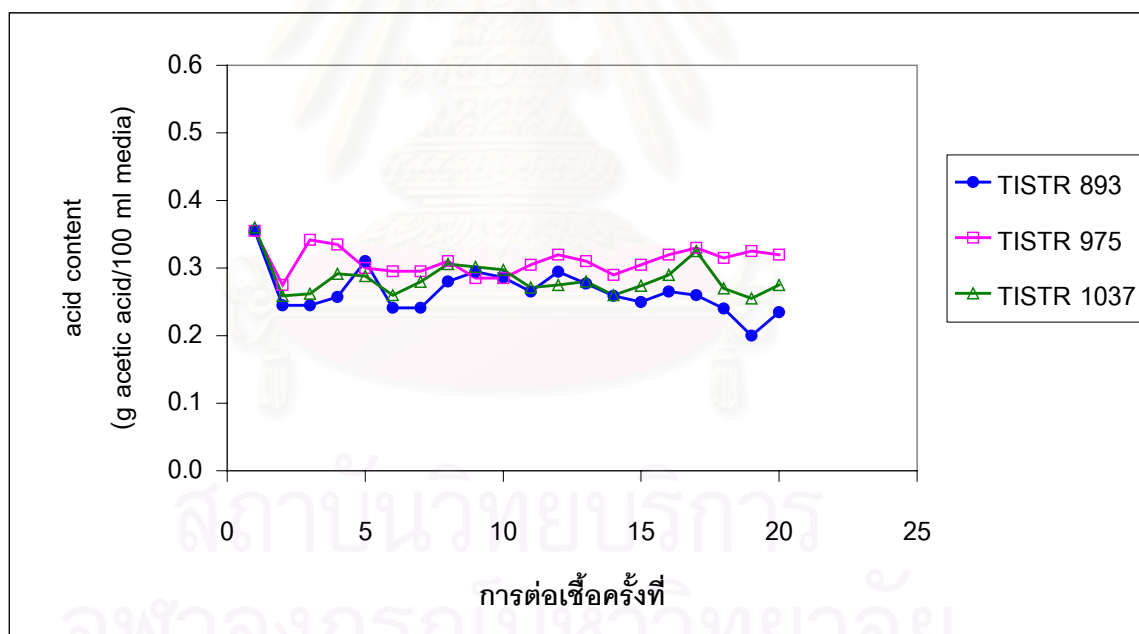
#### 4.5.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่ภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 60 วัน ต่อเชื้อทุก 3 วัน เมื่อทำการต่อเชื้อแต่ละครั้ง ได้ติดตามผลค่าความเป็นกรดต่างในอาหาร ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นและปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.21–4.23

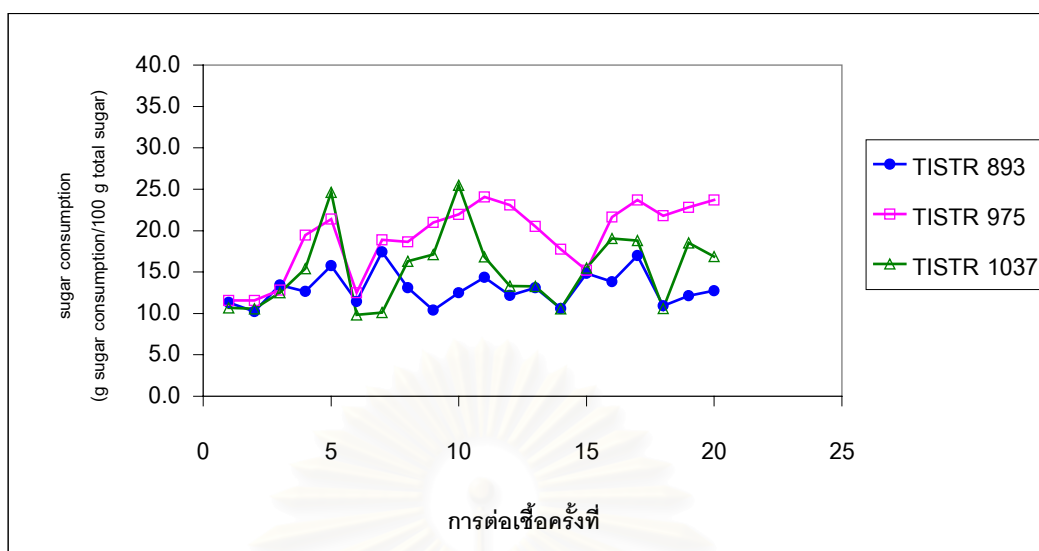




รูปที่ 4.21 : ค่า pH ของอาหารจากการเลี้ยง *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ภาวะเขย่า

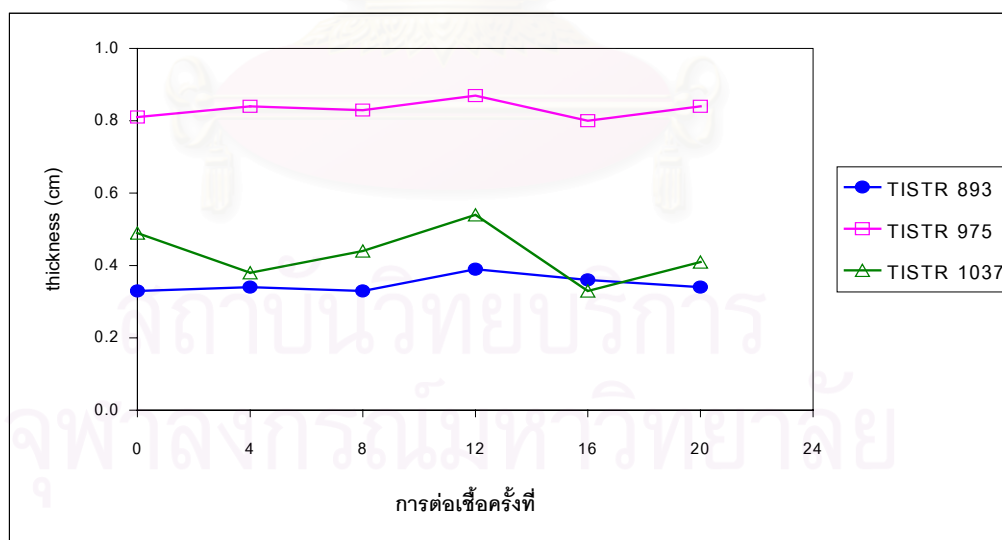


รูปที่ 4.22 : ปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ภาวะเขย่า

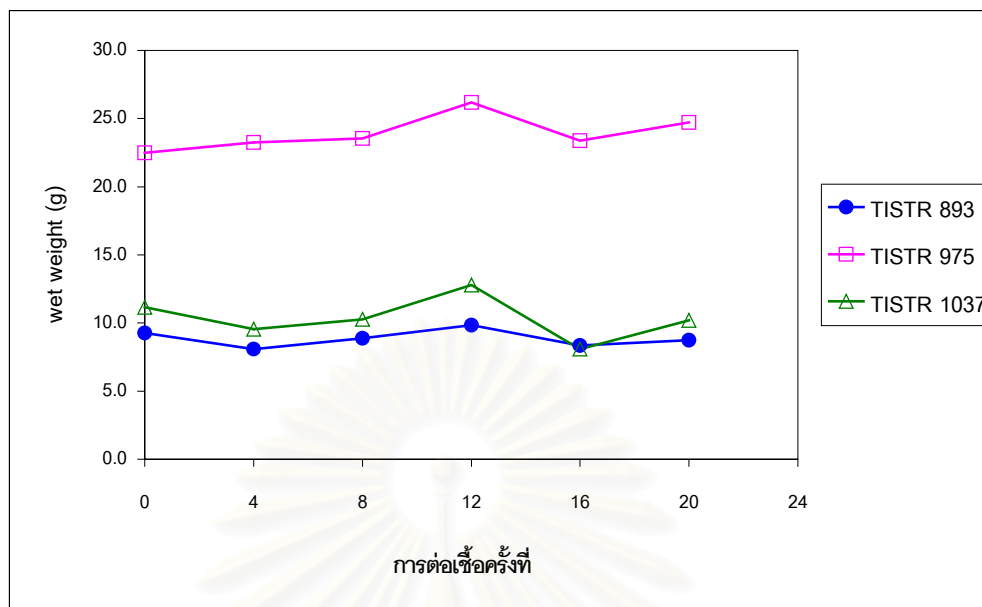


รูปที่ 4.23 : ปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ภาวะเขย่า

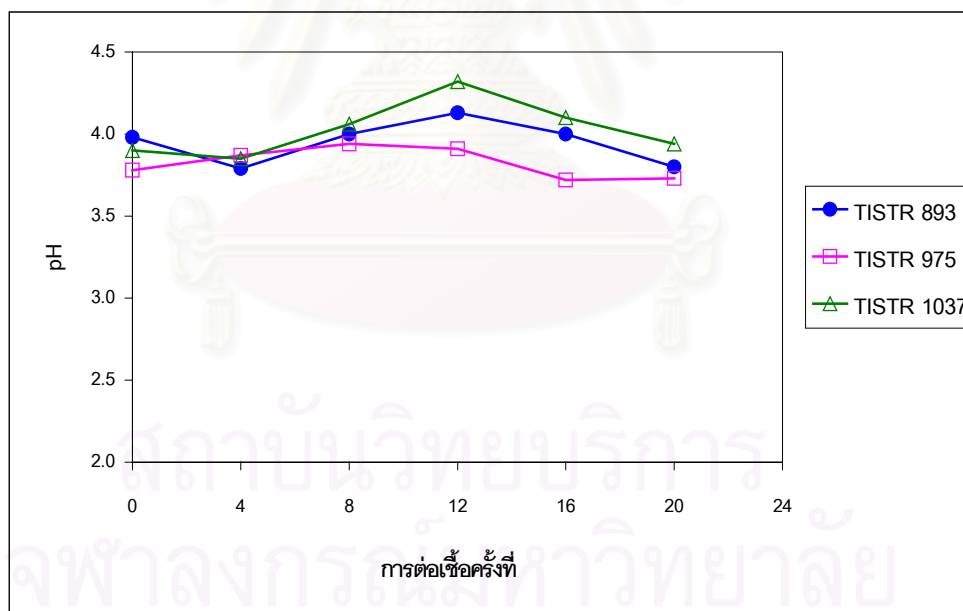
พบว่าค่า pH และปริมาณกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างน้อยแต่ค่อนข้างเปลี่ยนแปลงสูงกว่าการเลี้ยงในภาชนะนิ่ง ส่วนปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงสูงและเมื่อทำการต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง นำเชื้อมาวัดสมบัติการสร้างวุ้น ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.24–4.30



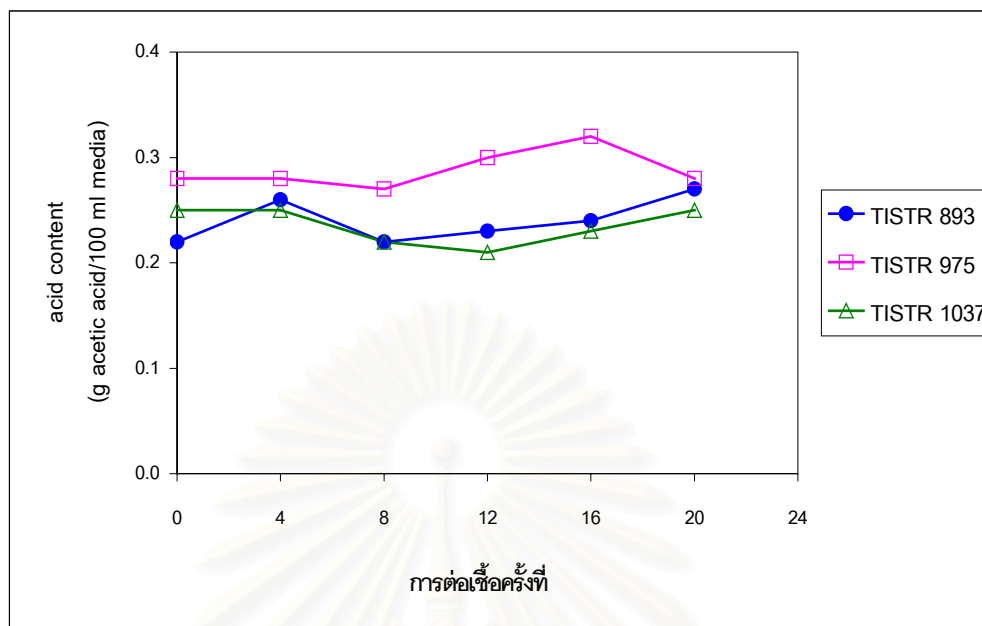
รูปที่ 4.24 : ความหนาของวุ้นเซลลูโลสที่ผลิตโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า



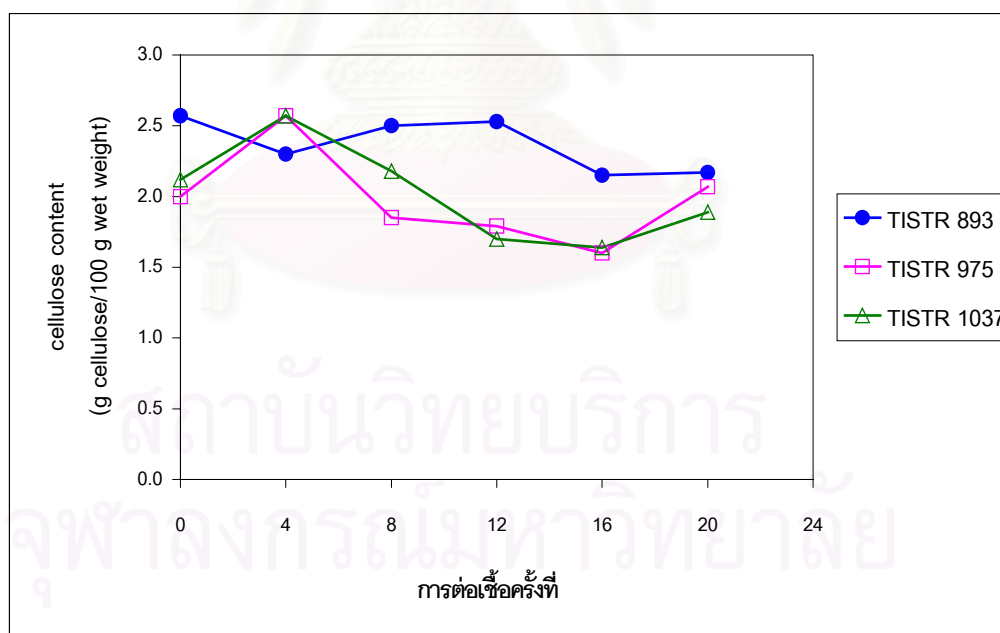
รูปที่ 4.25 : น้ำหนักเปียกของวุ้นเซลล์ลูลิสที่ผลิตโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า



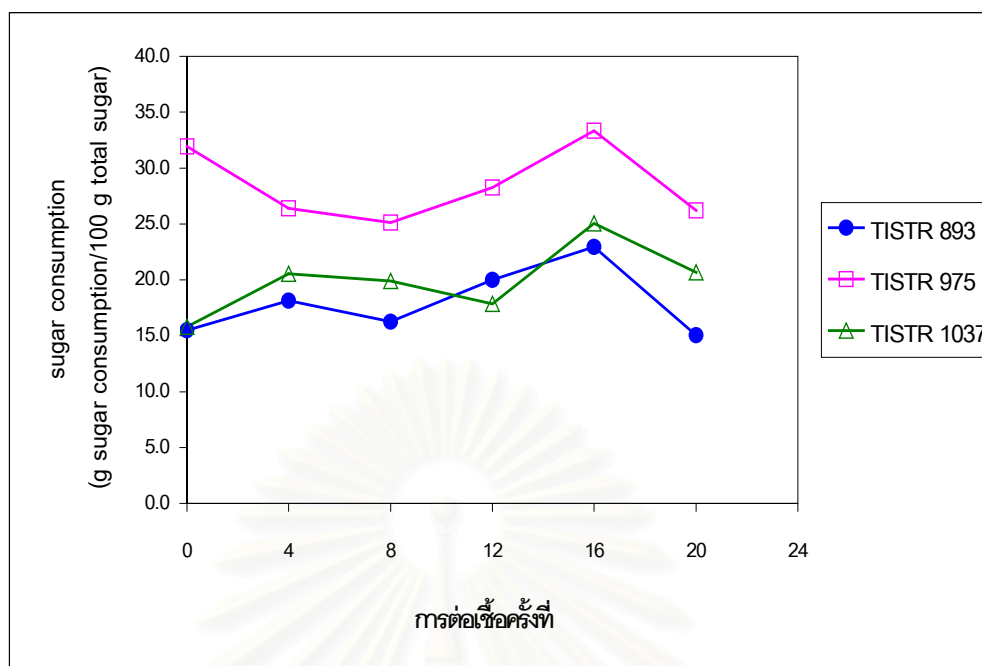
รูปที่ 4.26 : ค่า pH ของอาหารจากการเลี้ยง *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า



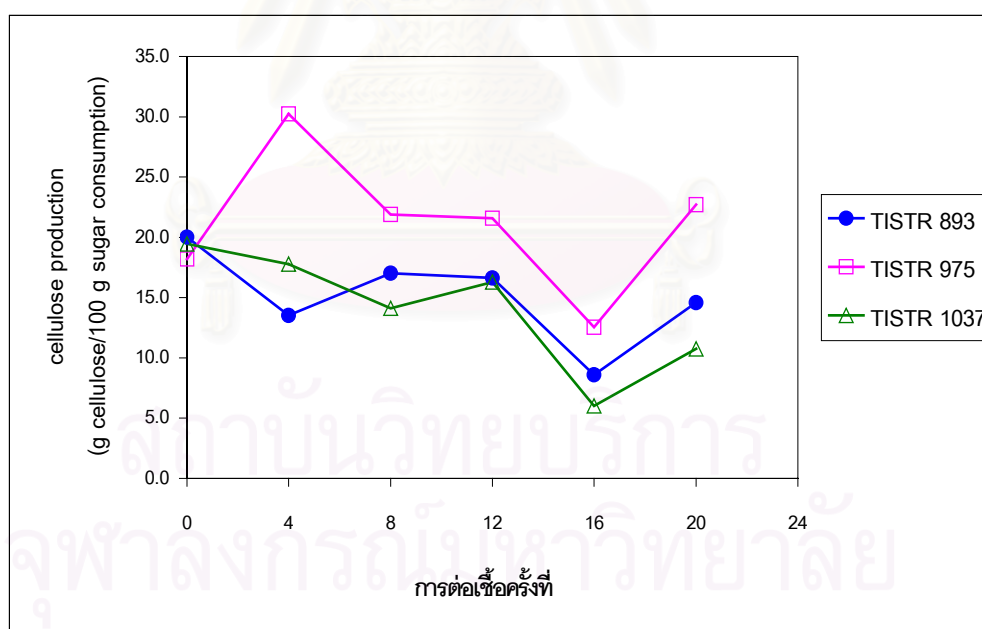
รูปที่ 4.27 : ปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า



รูปที่ 4.28 : ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียกของวุ้นเซลลูโลสที่ผลิตโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า



รูปที่ 4.29 : ปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำตาลมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า



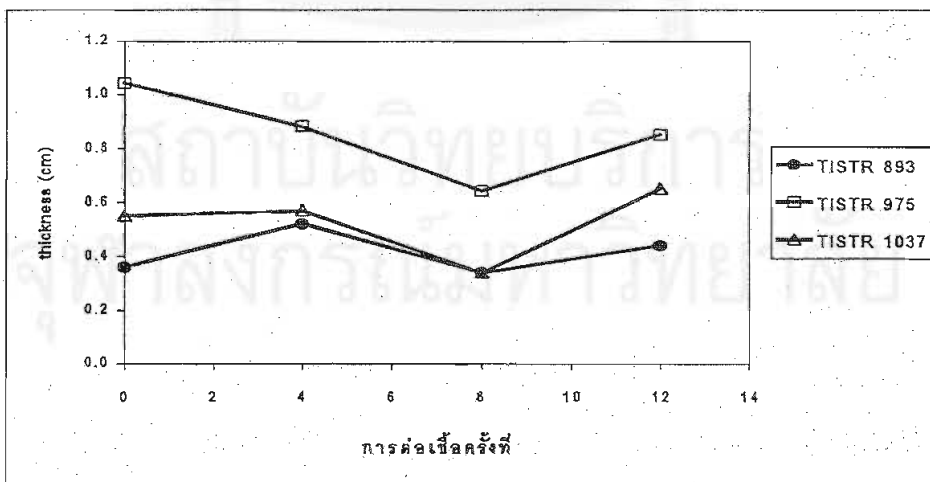
รูปที่ 4.30 : การผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำตาลมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า

จากผลการวัดการสร้างวุ้นของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่า *Acetobacter* sp. TISTR 975 ยังคงเป็นสายพันธุ์ที่มีการสร้างแผ่นวุ้นได้หนาที่สุด ให้น้ำหนักเปียกสูงสุด ผลิตรวดและใช้น้ำตาลมากที่สุดด้วย เมื่อพิจารณาถึงผลผลิตเซลล์ลูโลสที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ซึ่งจากผลการทดลองก่อนหน้านี้ *Acetobacter* sp. TISTR 893 จะเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลสูงสุด รองลงมาคือ TISTR 1037 แต่จากการทดลองนี้พบว่า ผลผลิตเซลล์ลูโลสที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ของสายพันธุ์ TISTR 893 และ TISTR 1037 มีค่าลดลง ในขณะที่ของสายพันธุ์ TISTR 975 มีค่าอยู่ในช่วงเดิม จึงทำให้ในการทดลองนี้ผลผลิตเซลล์ลูโลสที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ของ *Acetobacter* sp. TISTR 975 มีค่าสูงสุด

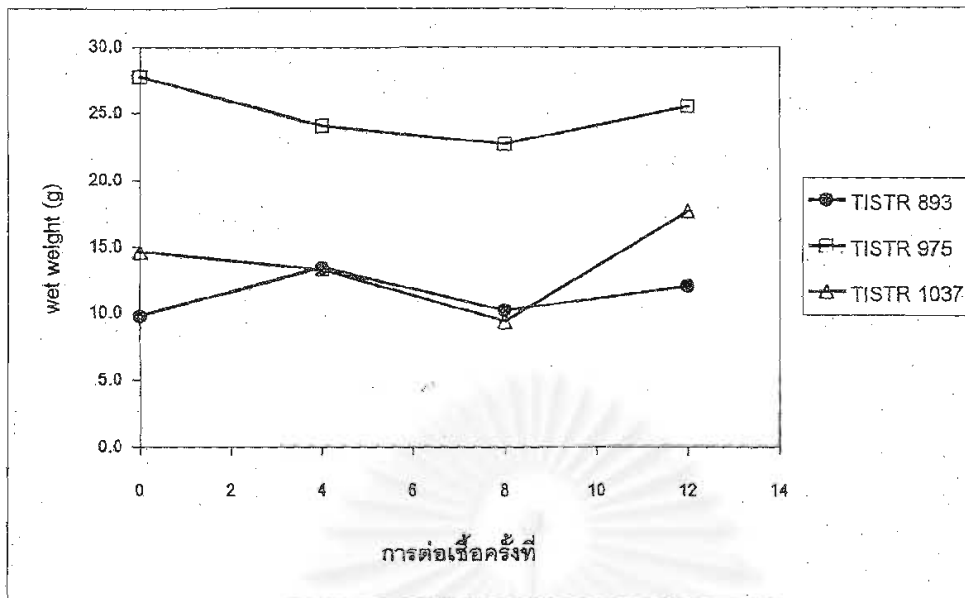
จากการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อในอาหารเหลวที่ภาวะเยาะ ทำให้เกิดเชื้อที่เกิดการแปรผัน 2 สายพันธุ์ ตั้งชื่อเป็น 975A เนื่องจากเกิดจากการแปรผันมาจาก *Acetobacter* sp. TISTR 975 พบเมื่อทำการ streak ลงบนอาหารแข็งจากการต่อเชื้อครั้งที่ 16 และ 1037A เนื่องจากเกิดการแปรผันจาก *Acetobacter* sp. TISTR 1037 พบเมื่อทำการ streak ลงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าวจากการต่อเชื้อครั้งที่ 16 เช่นเดียวกัน

#### 4.5.3 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง

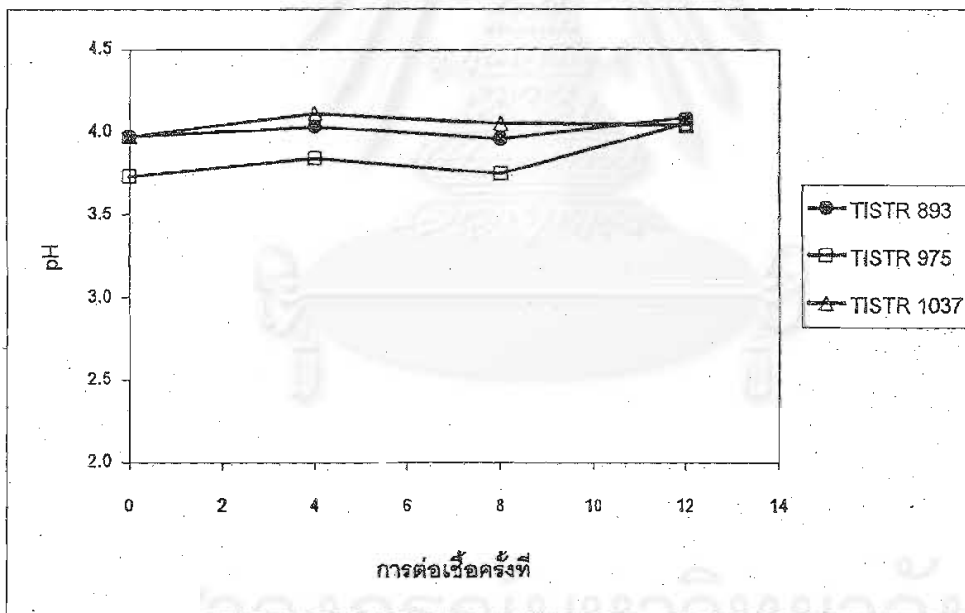
ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวสลับกับอาหารแข็งน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 84 วัน ต่อเชื้อทุก 7 วัน เมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ทำการวัดการสร้างวุ้นของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.31 - 4.37



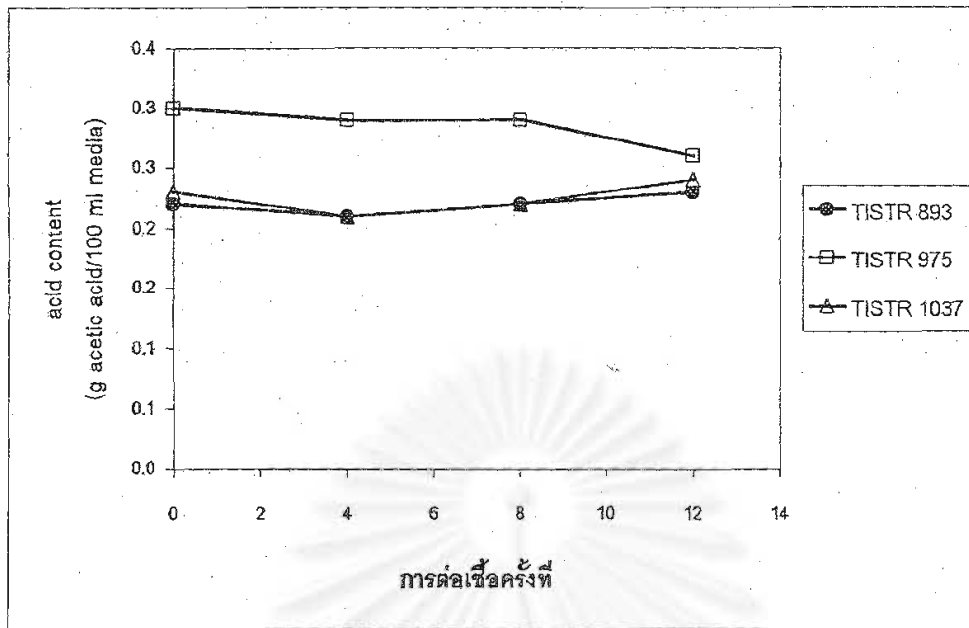
รูปที่ 4.31 : ความหนาของวุ้นเซลล์ลูโลสที่ผลิตโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง



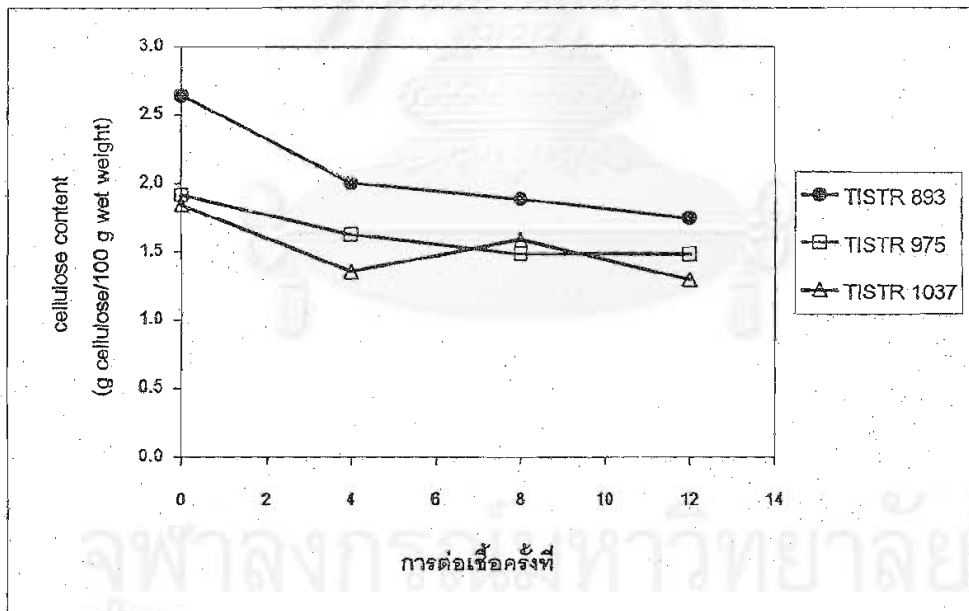
รูปที่ 4.32 : น้ำหนักเปียกของวุ้นเซลล์ูโลสที่ผลิตโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง



รูปที่ 4.33 : ค่า pH ของอาหารจากการเลี้ยง *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง

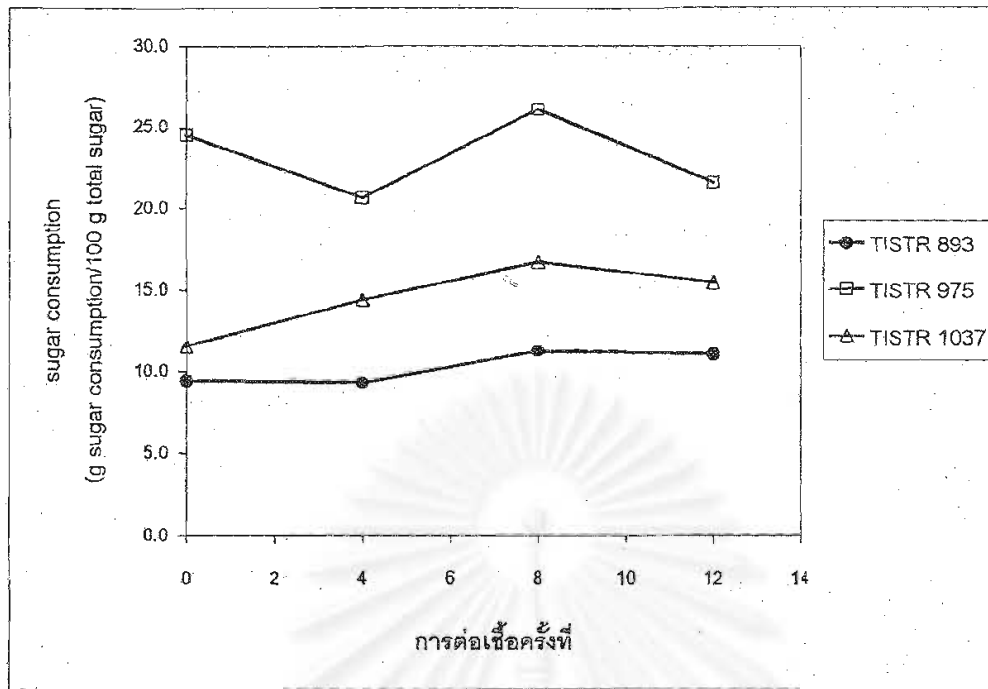


รูปที่ 4.34 : ปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง

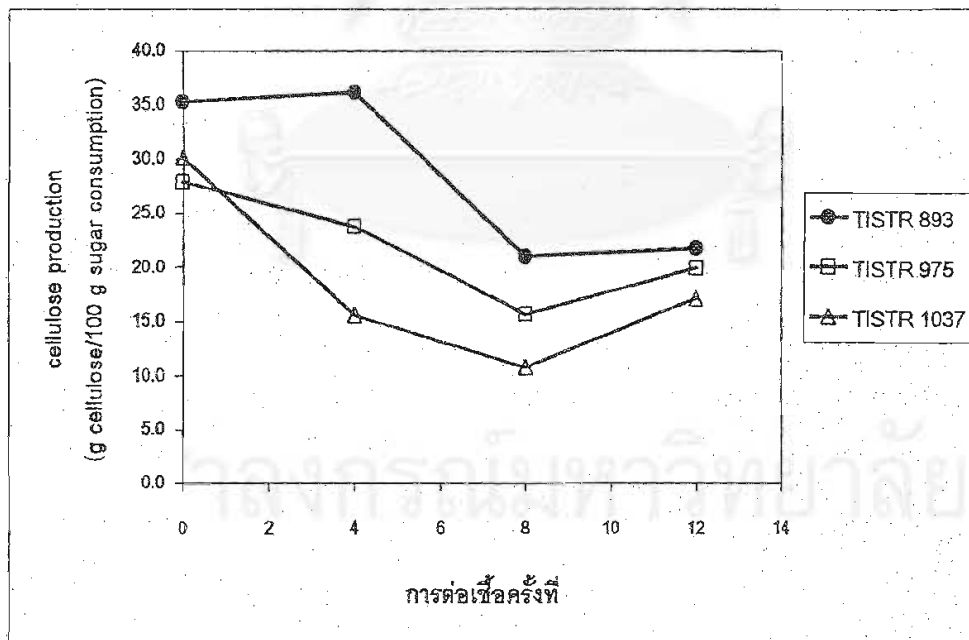


รูปที่ 4.35 : ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียกของวุ้นเซลลูโลสที่ผลิตโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง





รูปที่ 4.36 : ปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำตาลมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำการเลี้ยง ในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง



รูปที่ 4.37 : การผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำตาลมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำการเลี้ยง

จากผลการวัดการสร้างวุ้นของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่า *Acetobacter* sp. TISTR 975 ยังคงเป็นสายพันธุ์ที่มีการสร้างแผ่นวุ้นได้หนาที่สุด ให้น้ำหนักเปียกสูงสุด ผลิตรวดและใช้น้ำตาลมากที่สุดเหมือนเดิม ส่วนผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้นั้น ในการทดลองนี้สายพันธุ์ TISTR 1037 ให้ผลน้อยลง จึงทำให้สายพันธุ์ TISTR 975 มีการผลิตเซลล์เป็นอันดับสองรองจาก TISTR 893

จากการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อในอาหารเหลวสลักับอาหารแข็ง ทำให้เกิดเชื้อที่เกิดการแปรผัน 1 สายพันธุ์ ตั้งชื่อเป็น 893A เนื่องจากเกิดจากการแปรผันมาจาก *Acetobacter* sp. TISTR 893 พบเมื่อทำการ streak ลงบนอาหารแข็งจากการต่อเชื้อครั้งที่ 10

ค่าเฉลี่ยของลักษณะที่ทำการวัดหลังจากการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อในอาหารเหลวที่ภาวะนิ่งและภาวะเขย่าของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถแสดงเปรียบเทียบได้ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะที่ทำการวัดจากการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C ที่ภาวะนิ่งและภาวะเขย่าของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์

ภาวะการเลี้ยง	mean <sup>1</sup>					
	ภาวะนิ่ง/สายพันธุ์ TISTR			ภาวะเขย่า/สายพันธุ์ TISTR		
	893	975	1037	893	975	1037
Characteristics						
pH	4.24	4.17	4.18	3.93	3.82	3.89
Acid content (g acetic acid/100 ml media)	0.20	0.22	0.22	0.27	0.28	0.28
Sugar consumption (g sugar consumption/100 g total sugar)	10.70	13.36	10.87	13.00	19.20	15.29

<sup>1</sup> ค่าเฉลี่ยจากการวัดหลังจากการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อ 20 ครั้ง

พบว่าในการเลี้ยงเชื้อที่ภาวะนิ่ง เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์จะสร้างกรดและใช้น้ำตาลได้น้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อในภาวะเขย่า และเมื่อเปรียบเทียบความแปรปรวนของลักษณะทั้ง 3 จากการเลี้ยงเชื้อใน 2 ภาวะ พบว่าการเลี้ยงเชื้อในภาวะเขย่าจะมีผลทำให้สมบัติของเชื้อเกิดความแปรปรวนได้สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในภาวะนิ่ง

เมื่อทำการต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง จะนำเชื้อมาทดสอบลักษณะการสร้างวุ้นโดยเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งค่าเฉลี่ยของลักษณะต่างๆ ที่ทำการวัดสามารถแสดงเปรียบเทียบได้ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 : เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะการสร้างวุ้น วัดหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง  
 ที่ทำการเลี้ยงใน 3 ภาวะของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์โดยเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว  
 ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

สายพันธุ์	mean								
	TISTR 893/ภาวะการเลี้ยง			TISTR 975/ภาวะการเลี้ยง			TISTR 1037/ภาวะการเลี้ยง		
	นิ่ง <sup>1</sup>	เขย่า <sup>1</sup>	สลัด <sup>2</sup>	นิ่ง <sup>1</sup>	เขย่า <sup>1</sup>	สลัด <sup>2</sup>	นิ่ง <sup>1</sup>	เขย่า <sup>1</sup>	สลัด <sup>2</sup>
Characteristics									
Thickness (cm)	0.38	0.35	0.41	0.79	0.83	0.85	0.53	0.43	0.53
Wet weight (g)	10.02	8.86	11.34	22.00	23.93	24.99	13.34	10.35	13.71
pH	4.03	3.95	4.01	3.76	3.82	3.85	4.03	4.03	4.04
Acid content (g acetic acid/100 ml media)	0.23	0.24	0.22	0.31	0.29	0.28	0.23	0.24	0.23
Cellulose content (g cellulose/ 100 g wet weight)	2.81	2.37	2.07	1.96	1.98	1.62	2.15	2.09	1.52
Sugar consumption (g sugar consumption/100 g total sugar)	15.52	17.94	10.28	30.27	28.54	23.20	17.03	19.98	14.50
Cellulose production (g cellulose/100 g sugar consumption)	23.18	15.06	28.52	18.04	21.20	21.78	21.80	14.07	18.38

<sup>1</sup> ค่าเฉลี่ยจากการวัดการสร้างวุ้นเป็นจำนวน 5 ครั้ง

<sup>2</sup> ค่าเฉลี่ยจากการวัดการสร้างวุ้นเป็นจำนวน 3 ครั้ง

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติการสร้างวุ้นของเชื้อ *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 893 ที่วัดหลังจากการเลี้ยงใน 3 ภาวะ กับสมบัติการสร้างวุ้นตั้งต้นในตารางที่ 4.2 พบว่า สมบัติการใช้น้ำตาลเพิ่มขึ้นแต่การผลิตเซลลูโลสลดลง โดยภาวะที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูงที่สุด คือ หลังจากการเลี้ยงในภาวะเขย่า ส่วนสายพันธุ์ TISTR 975 มีสมบัติที่มีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับเชื้อตั้งต้น คือ ความหนาและน้ำหนักเปียกของแผ่นวุ้นลดลง ใช้น้ำตาลสูงขึ้นจึงทำให้การผลิตเซลลูโลสลดลง โดยภาวะที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูงที่สุด คือ หลังจากการเลี้ยงในภาวะนิ่ง และสายพันธุ์ TISTR 1037 มีการเปลี่ยนแปลงของสมบัติการสร้างวุ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสมบัติตั้งต้นคล้ายกับ

สายพันธุ์ TISTR 893 คือ มีการใช้น้ำตาลเพิ่มขึ้นแต่การผลิตเซลลูโลสลดลง ส่วนความหนาและน้ำหนักเปียกของแผ่นวุ้นมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างน้อย โดยภาวะที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูงสุดคือ หลังจากการเลี้ยงในภาวะเขย่า

จากการต่อเชื้อโดยวิธีทั้ง 3 วิธี ทำให้เกิดเชื้อแปรผัน 4 สายพันธุ์ คือ 893A 975A 975B และ 1037A โดยการแปรผันที่เกิดขึ้นสังเกตจากลักษณะของโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไปบนอาหารแข็ง น้ำมะพร้าว โคโลนีของ 893A มีลักษณะแตกต่างไปจากโคโลนีของ TISTR 893 ตรงที่โคโลนีของ 893A มีลักษณะแบนมาก ขอบไม่เรียบเป็นหยัก สีค่อนข้างเหลืองมากกว่า ผิวมีความมันวาวมากขึ้น มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.5-4 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.38



(a)

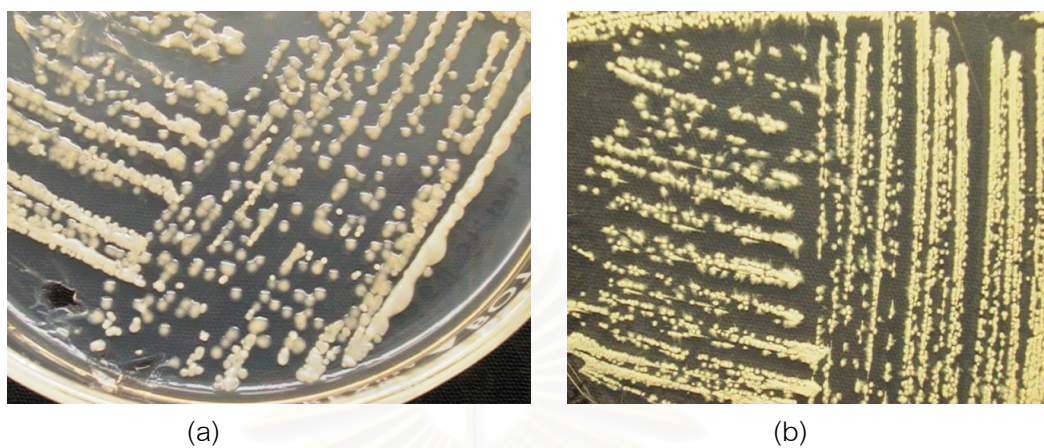


(b)

รูปที่ 4.38 : ลักษณะโคโลนีของ 893A (a) เปรียบเทียบกับโคโลนีของ TISTR 893 (b)

เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

โคโลนีของ 975A มีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 มิลลิเมตร ลักษณะของโคโลนีเป็นเมือกเยิ้มและไม่หนูนสูงเหมือนเดิม เมื่อใช้ loopแตะที่โคโลนีจะไม่ติดขึ้นมาทั้งหมดเหมือนโคโลนีทั่วไปของ *Acetobacter xylinum* ส่วนโคโลนีของ 975B มีลักษณะแบน ไม่กลม ขอบไม่เรียบเป็นขุย ผิวมีความมันวาวมาก มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.39



(a)

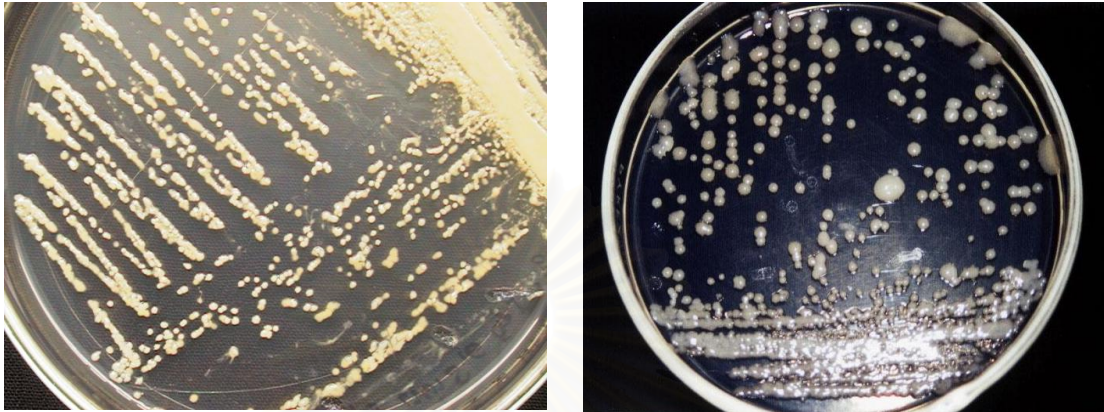
(b)



(c)

รูปที่ 4.39 : ลักษณะโคโลนีของ 975A (a) และ 975B (b) เปรียบเทียบกับโคโลนีของ TISTR 975 (c) เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

โคโลนีของ 1037A มีขนาดเล็กลงมาก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร สีของโคโลนีค่อนข้างเหลืองขึ้นกว่าเดิม มีความเป็นเมือกเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 4.40



(a)

(b)

รูปที่ 4.40 : ลักษณะโคโลนีของ 1037A (a) เปรียบเทียบกับโคโลนีของ TISTR 1037 (b)

เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

ในบางครั้งเมื่อทำการ streak จะพบโคโลนีที่มีลักษณะผิดปกติ แต่เมื่อทำการ streak ซ้ำอีกครั้ง โคโลนีที่มีลักษณะผิดปกตินี้ก็กลับไปมีลักษณะเหมือนเดิม การแปรผันที่เกิดขึ้นจึงค่อนข้างเป็นการแปรผันแบบไม่ถาวร คือ มีการกลับไปมาได้ ดังนั้นเมื่อพบโคโลนีที่มีลักษณะแปลกไป จะต้องใช้โคโลนีนั้นไปศึกษาสมบัติอื่นต่อทันที เชื้อทั้ง 4 ที่พบนี้ มีลักษณะโคโลนีที่ไม่เปลี่ยนแปลงกลับไปเป็นแบบเดิม แม้จะทำการ streak ซ้ำ จึงนำมาทดสอบลักษณะทางชีวเคมี ดังแสดงในตารางที่ 4.5

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 : ผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของ *Acetobacter* sp. 7 สายพันธุ์

Strain	TISTR 893	893A	TISTR 975	975A	975B	TISTR 1037	1037A
Characteristics	893		975			1037	
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+
Ketogenesis from glycerol	+	+	+	-	+	+	+
Growth on :							
Glucose-mannitol agar (MGYP)	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol agar (MYP)	+	+	+	+	+	+	+
GYPG	+	+	+	+	+	+	+
Acid and cellulose production from :							
Glucose	+/c	+/c	+/c	+/c	+/c	+/c	+/c
Ethanol	-	+	-	-	-	-	-
Fructose	+/c	+/c	+/c	+/c	+/c	+/c	+/c
Galactose	+/c	+/c	+/c	+/c	+/c	+/c	+/c
Glycerol	-	+	-	+	+	+	-
Maltose	+/c	-/c	-/c	+	+	-/c	-
Mannitol	+/c	-/c	+/c	-	+/c	+/c	-/c
Sorbitol	-/c	-/c	-/c	-	-	-/c	-/c
Sucrose	+/c	+/c	+/c	+/c	+/c	+/c	-/c
Xylose	+/c	+/c	+/c	+	+/c	+/c	+/c

+ : positive reaction    - : negative reaction or no growth    c : cellulose production

ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อที่เกิดการแปรผันที่ยังคงเหมือนเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อตั้งต้น คือ การสร้างเอนไซม์คาตาเลส การเจริญเติบโตบนอาหาร MGYP MYP และ GYPG และการเกิดปฏิกิริยาดีโตเจนเนซิสจากกลีเซอรอล ยกเว้น 975A ที่ไม่เกิดปฏิกิริยานี้ ส่วนลักษณะที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด คือ การสร้างกรดและเซลลูโลสจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

เมื่อศึกษาการสร้างวุ้นของเชื้อที่เกิดการแปรผันพบว่าการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงในตารางที่ 4.6-4.8

ตารางที่ 4.6 : เปรียบเทียบการสร้างวุ้นระหว่าง *Acetobacter* sp. TISTR 893 กับ 893A เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

Characteristics	Strain	mean <sup>1</sup> ± SD	
		TISTR 893	893A
Thickness (cm)		0.36 ± 0.03	0.38 ± 0.03
Wet weight (g)		9.78 ± 0.75	10.54 ± 0.27
pH		3.97 <sup>a</sup> ± 0.05	4.16 <sup>b</sup> ± 0.03
Acid content (g acetic acid/100 ml media)		0.22 <sup>b</sup> ± 0.01	0.19 <sup>a</sup> ± 0.07
Cellulose content (g cellulose/100 g wet weight)		2.64 <sup>b</sup> ± 0.08	2.18 <sup>a</sup> ± 0.17
Sugar consumption (g sugar consumption/100 g total sugar)		9.43 <sup>a</sup> ± 0.35	20.20 <sup>b</sup> ± 2.19
Cellulose production (g cellulose/100 g sugar consumption)		35.27 <sup>b</sup> ± 2.88	12.97 <sup>a</sup> ± 0.89

<sup>1</sup> ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 5 ซ้ำ

a,b,c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวบนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p ≤ 0.05)



ตารางที่ 4.7 : เปรียบเทียบการสร้างขี้ระหว่าง *Acetobacter* sp. TISTR 975 975A และ 975B  
เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

Characteristics	Strain	mean <sup>1</sup> ± SD		
	TISTR 975	975A	975B	
Thickness (cm)	1.04 <sup>c</sup> ± 0.08	0.63 <sup>b</sup> ± 0.05	0.41 <sup>a</sup> ± 0.10	
Wet weight (g)	27.73 <sup>c</sup> ± 1.50	20.08 <sup>b</sup> ± 2.50	11.51 <sup>a</sup> ± 2.71	
pH	3.73 <sup>a</sup> ± 0.04	3.82 <sup>ab</sup> ± 0.21	3.99 <sup>b</sup> ± 0.11	
Acid content (g acetic acid/100 ml media)	0.30 <sup>b</sup> ± 0.01	0.30 <sup>b</sup> ± 0.04	0.25 <sup>a</sup> ± 0.03	
Cellulose content (g cellulose/100 g wet weight)	1.91 <sup>b</sup> ± 0.06	1.62 <sup>a</sup> ± 0.07	1.88 <sup>b</sup> ± 0.08	
Sugar consumption (g sugar consumption/100 g total sugar)	24.51 <sup>a</sup> ± 1.08	28.35 <sup>b</sup> ± 1.53	21.91 <sup>a</sup> ± 1.32	
Cellulose production (g cellulose/100 g sugar consumption)	27.88 <sup>b</sup> ± 1.39	13.02 <sup>a</sup> ± 1.39	11.36 <sup>a</sup> ± 3.50	

<sup>1</sup> ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 5 ซ้ำ

a,b,c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวบนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ 4.8 : เปรียบเทียบการสร้างวุ้นระหว่าง *Acetobacter* sp. TISTR 1037 กับ 1037A  
เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

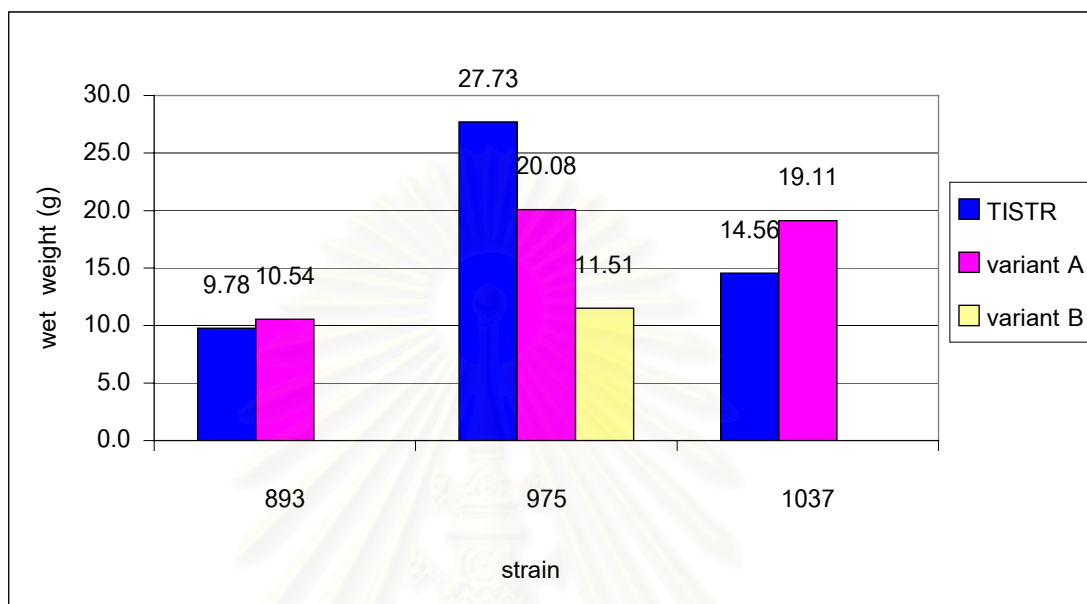
Characteristics	Strain	mean <sup>1</sup> ± SD	
		TISTR 1037	1037A
Thickness (cm)		0.55 <sup>a</sup> ± 0.04	0.64 <sup>b</sup> ± 0.04
Wet weight (g)		14.56 <sup>a</sup> ± 0.96	19.11 <sup>b</sup> ± 2.01
pH		3.97 <sup>a</sup> ± 0.09	4.15 <sup>b</sup> ± 0.08
Acid content (g acetic acid/100 ml media)		0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01
Cellulose content (g cellulose/100 g wet weight)		1.84 <sup>b</sup> ± 0.08	1.45 <sup>a</sup> ± 0.09
Sugar consumption (g sugar consumption/100 g total sugar)		11.52 <sup>a</sup> ± 0.71	19.40 <sup>b</sup> ± 1.70
Cellulose production (g cellulose/100 g sugar consumption)		30.10 <sup>b</sup> ± 3.12	16.51 <sup>a</sup> ± 1.54

<sup>1</sup> ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 5 ซ้ำ

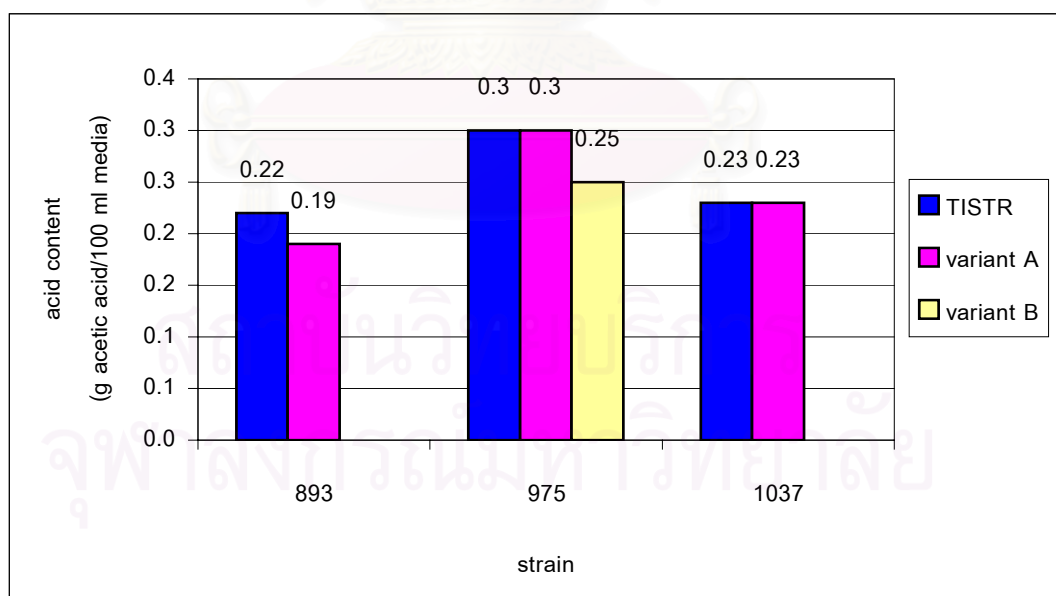
<sup>a,b,c</sup> ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

จากตารางพบว่า เชื้อที่เกิดการแปรผันมีสมบัติในการสร้างวุ้นต่างไปจากเชื้อตั้งต้น โดยที่ 893A สร้างวุ้นที่มีความหนาและน้ำหนักเปียกได้เท่ากับ 0.38 เซนติเมตร และ 10.54 กรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจาก TISTR 893 อย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณเซลลูโลสที่ได้ต่อน้ำหนักเปียกลดลงเป็น 2.18 กรัม ใช้ น้ำตาลมากขึ้นเป็น 20.20 กรัม ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณเซลลูโลสที่ได้ต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ลดลงเป็น 12.97 กรัม 975A และ 975B สร้างวุ้นที่มีความหนาและน้ำหนักเปียกน้อยลงเป็น 0.63 เซนติเมตร 0.41 เซนติเมตร 20.08 กรัมและ 11.51 กรัม ตามลำดับ 975A สร้างวุ้นที่มีปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียกลดลงเป็น 1.62 กรัม และใช้น้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 28.35 กรัม ในขณะที่ 975B มีปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียกไม่ต่างจาก TISTR 975 อย่างมีนัยสำคัญ แต่ 975B สร้างกรดน้อยลงเป็น 0.25 กรัม ทำให้ 975A มีปริมาณเซลลูโลสที่ได้ต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ลดลงเป็น 13.02 กรัม และ 975B มีปริมาณเซลลูโลสที่ได้ต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ลดลงเป็น 11.36 กรัม 1037A สร้างวุ้นที่มีความหนาและน้ำหนักเปียกเพิ่มขึ้นเป็น 0.64 เซนติเมตร และ 19.11 กรัม ตามลำดับ แต่วุ้นมี

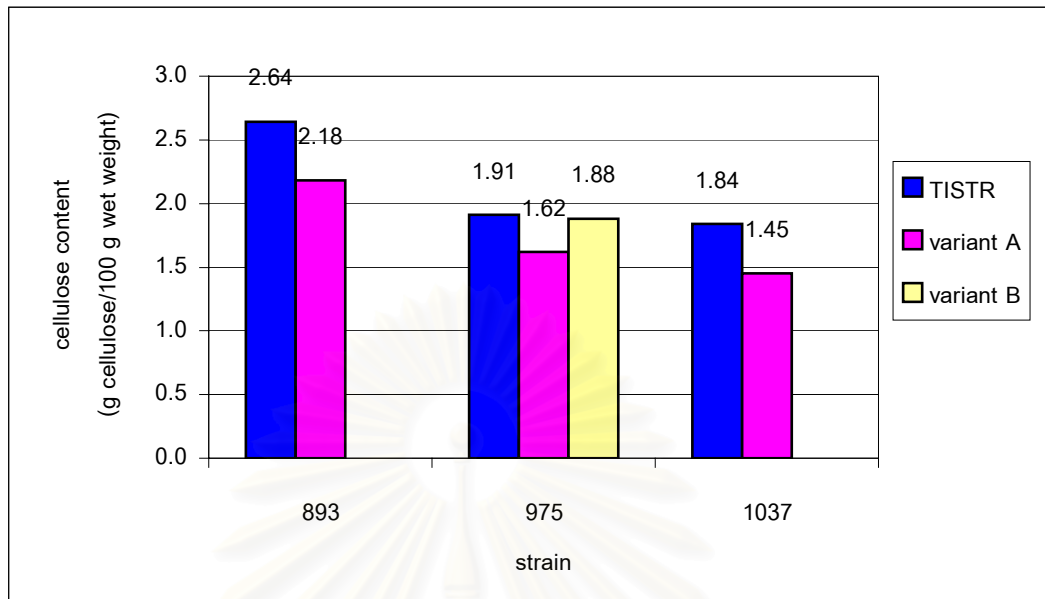
ปริมาณเซลล์ต่อน้ำหนักเปียกลดลงเป็น 1.45 กรัม ใช้น้ำตาลมากขึ้นเป็น 19.40 กรัม จึงทำให้มีปริมาณเซลล์ที่ได้ต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้น้อยลงเป็น 16.51 กรัม ดังแสดงในรูปที่ 4.41-4.45



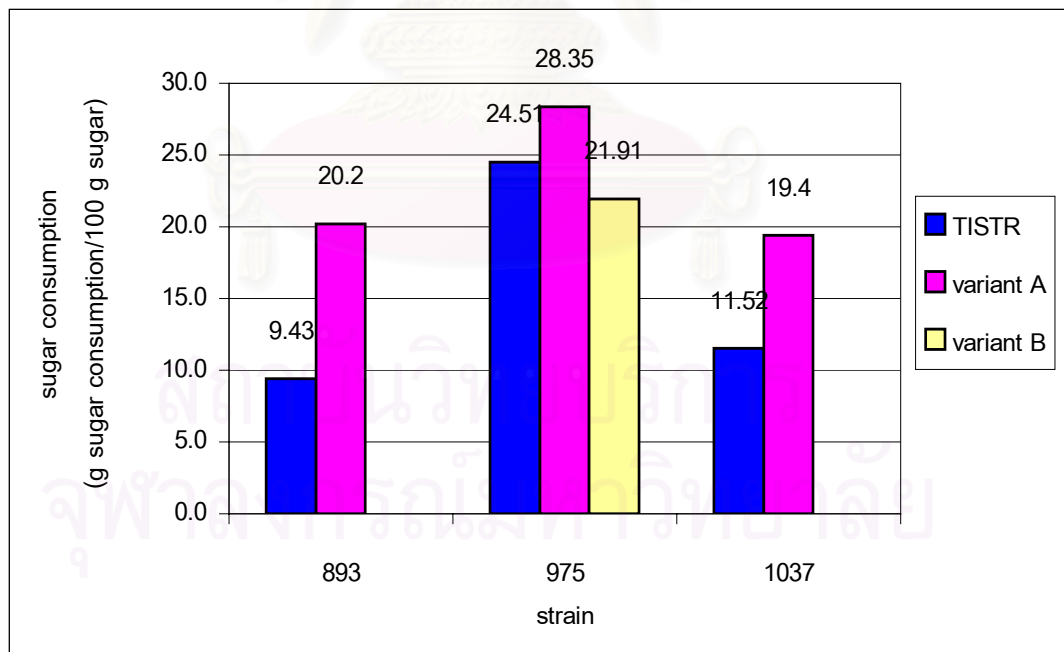
รูปที่ 4.41 : การเปรียบเทียบน้ำหนักเปียกของวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ที่แปรผัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำตาลมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน



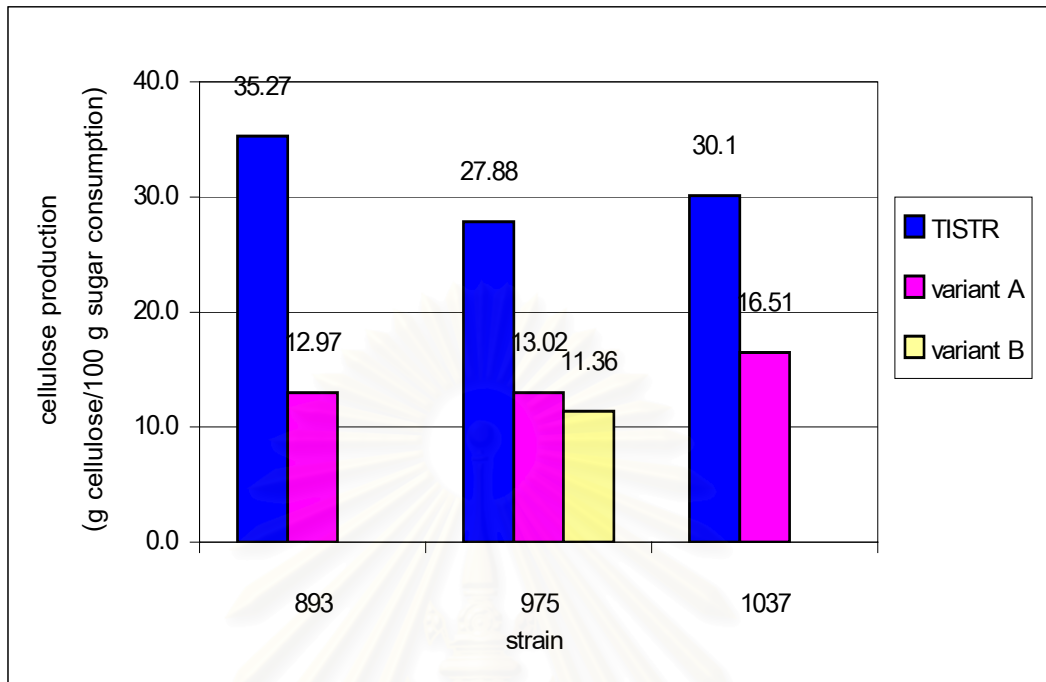
รูปที่ 4.42 : การเปรียบเทียบปริมาณกรดในอาหารจากการเลี้ยง *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่แปรผันในอาหารเหลวน้ำตาลมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.43 : การเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียกของวุ้นที่ผลิตโดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่แปรผัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.44 : การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่ใช้โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่แปรผัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.45 : การเปรียบเทียบการผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ที่แปรผัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

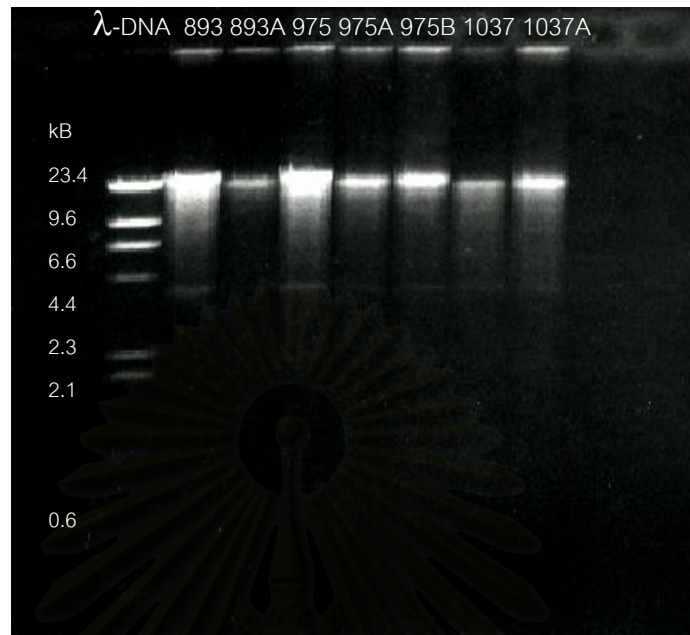
#### 4.6 ลักษณะทางพันธุกรรมของ *Acetobacter* sp.

ทำการสกัดดีเอ็นเอของ *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ตั้งต้นและ 4 สายพันธุ์ที่เกิดการแปรผันนำมาเปรียบเทียบโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ผลแสดงในรูปที่ 4.46

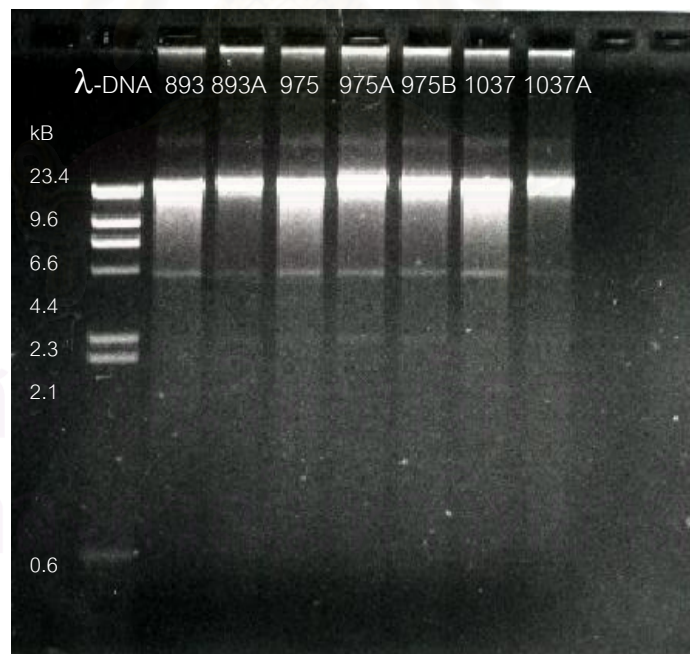


รูปที่ 4.46 : แถบดีเอ็นเอของ *Acetobacter* sp. 7 สายพันธุ์บนอะกาโรสเจล

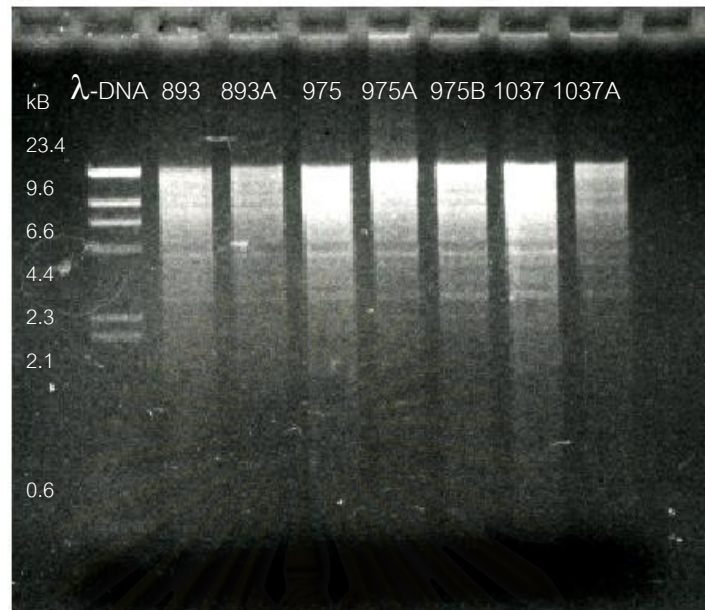
เมื่อได้ดีเอ็นเอแล้วทำการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์รีstriction 8 ชนิด ดังนี้ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Nde*I, *Pvu*II, *Sal*I และ *Xba*I ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.47- 4.54



รูปที่ 4.47 : แถบดีเอ็นเอของ *Acetobacter* sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์  
ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI บนอะกาโรสเจล



รูปที่ 4.48 : แถบดีเอ็นเอของ *Acetobacter* sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์  
ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI บนอะกาโรสเจล

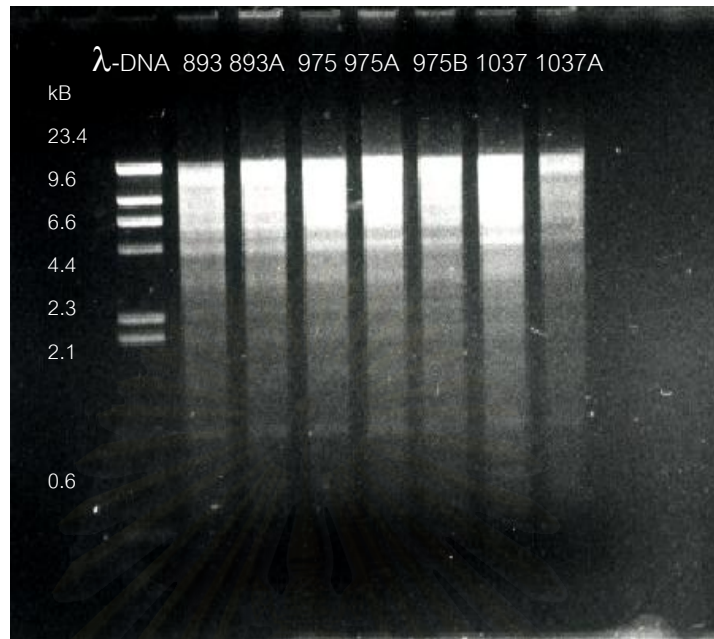


รูปที่ 4.49 : แถบดีเอ็นเอของ *Acetobacter* sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์  
ด้วยเอนไซม์ *HindIII* บนอะกาโรสเจล

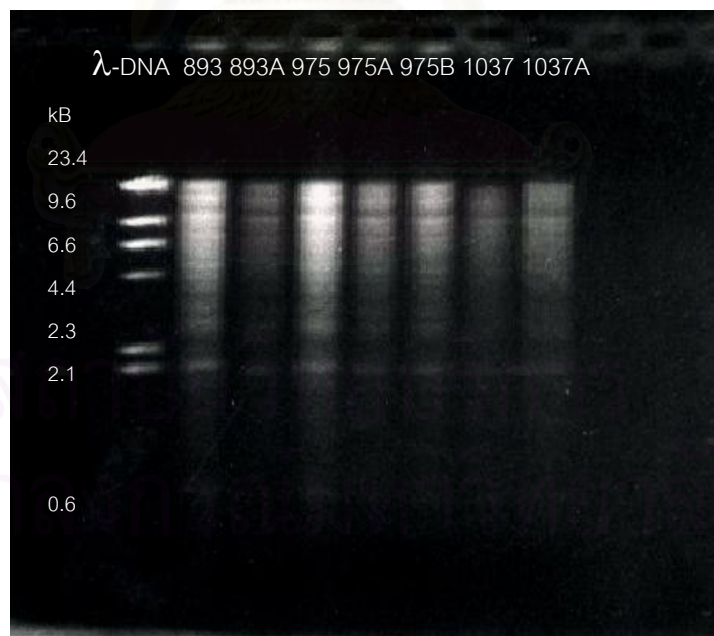


รูปที่ 4.50 : แถบดีเอ็นเอของ *Acetobacter* sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์  
ด้วยเอนไซม์ *KpnI* บนอะกาโรสเจล

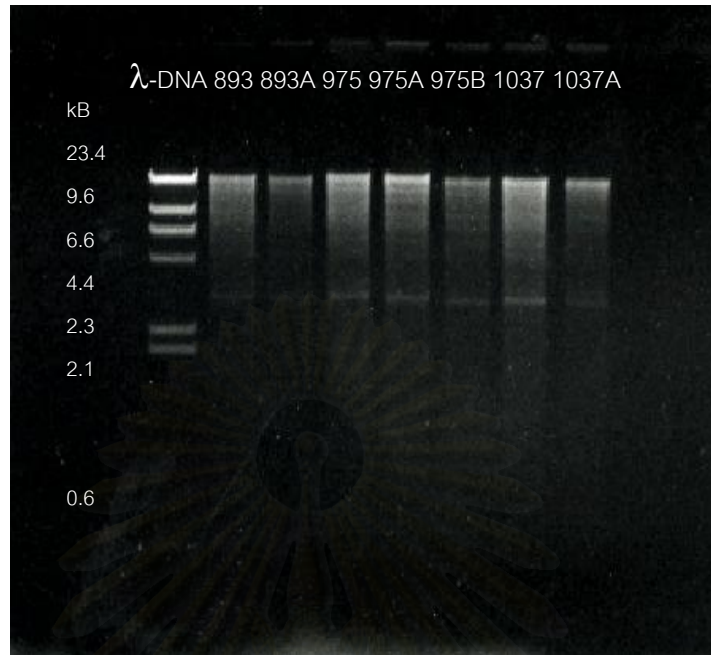




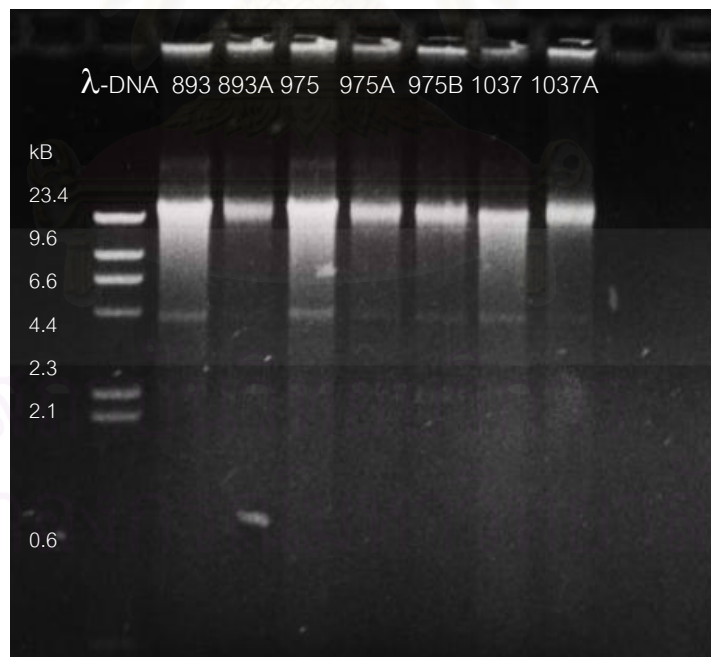
รูปที่ 4.51 : แอบริเอ็นเอของ *Acetobacter* sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *NdeI* บนอะกาโรสเจล



รูปที่ 4.52 : แอบริเอ็นเอของ *Acetobacter* sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *PvuII* บนอะกาโรสเจล



รูปที่ 4.53 : แถบดีเอ็นเอของ *Acetobacter* sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *SaI* บนอะกาโรสเจล



รูปที่ 4.54 : แถบดีเอ็นเอของ *Acetobacter* sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *XbaI* บนอะกาโรสเจล

ผลจากการตัดดีเอ็นเอของ *Acetobacter* sp. ทั้ง 7 สายพันธุ์ ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 8 ชนิด พบว่า ดีเอ็นเอจากทั้ง 7 สายพันธุ์ให้ผลจากการตัดที่เหมือนกัน โดยสังเกตจากลักษณะของแถบ ดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลทั้ง 7 ช่อง ที่ให้ลักษณะแถบไม่แตกต่างกัน



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

#### 5.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของ *Acetobacter* sp.

เมื่อทำการย้อมเซลล์ *Acetobacter* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์รวมทั้งเชื้อที่แปรผัน 4 สายพันธุ์ และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า *Acetobacter* sp. ทั้ง 7 สายพันธุ์ มีลักษณะเซลล์เป็นแท่ง (rod shape) ตรงหรือโค้งเล็กน้อย อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสาย ติดสีแกรมลบ (Gram-negative) ซึ่งเป็นลักษณะของจีโนส *Acetobacter* (Holt et al., 1994) รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียในจีโนส *Acetobacter* อาจจะมีทั้งเซลล์รูปร่างกลม ยาวรี ป่องตรงส่วนกลาง โค้งงอหรือเป็นสายก็ได้ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ไม่พบการสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ในเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ เซลล์ที่มีอายุน้อยย้อมติดสีแกรมลบ ส่วนเซลล์ที่มีอายุมากอาจจะย้อมติดสีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เซลล์มีทั้งแบบที่เคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ ถ้าเคลื่อนที่ได้จะอาศัยแฟลกเจลลาชนิดที่เป็น peritrichous คือมีแฟลกเจลลาอยู่รอบๆ เซลล์ (Breed et al., 1957)

Asai และคณะ (1964) จำแนกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มอะซิติกแอซิดแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่มคือ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* โดยอาศัยชนิดของแฟลกเจลลา ถ้าพบว่าเซลล์มีแฟลกเจลลาที่เป็นแบบ peritrichous จะจัดเป็น *Acetobacter* แต่ถ้าพบแฟลกเจลลาชนิดที่เป็น polar คือพบเฉพาะที่ขั้วเซลล์ จะจัดเป็น *Gluconobacter* แต่นอกเหนือจากชนิดของแฟลกเจลลาแล้ว ยังใช้สมบัติบางประการทางชีวเคมีในการจำแนกด้วย ซึ่งถ้าพบเชื้อที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มใดได้ก็จะจัดให้เป็น "Intermediate strain" แต่ Frateur (1950) (อ้างถึงใน De Ley et al., 1984) กล่าวว่า ชนิดของแฟลกเจลลาไม่สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกชนิดของอะซิติกแอซิดแบคทีเรียได้ เพียงแต่ใช้เป็นส่วนประกอบในการจำแนกและบ่งบอกชนิดของ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* เท่านั้น

ลักษณะโคโลนีของ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* บนอาหารแข็งจะแตกต่างจากโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่น เนื่องจาก เชื้อในกลุ่มนี้จะมีการสร้างเส้นใยเซลลูโลสออกสู่ภายนอกและพันอยู่รอบๆ เซลล์แม้เมื่อเซลล์มีการแบ่งตัว ทำให้เซลล์ถูกห่อหุ้มด้วยแผ่นซีทของเซลลูโลส (De Ley et al., 1984) นอกจากนี้ลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหารชนิดเดียวกันยังสามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการแบ่ง *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* ออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ กันได้อีกด้วย เห็นได้จาก *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ตั้งต้นที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ก็มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะ TISTR 975 ที่มีลักษณะโคโลนีที่หนูนสูงคล้ายระฆังคว่ำ ซึ่งแตกต่างจากโคโลนีของ TISTR 893 และ TISTR 1037 อย่างเห็นได้ชัด

## 5.2 ลักษณะทางชีวเคมีของ *Acetobacter* sp.

จากการทดลอง *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาตาเลส ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียในกลุ่มอะซิติกแอซิดแบคทีเรีย ที่แตกต่างจากแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดที่พบได้ในผลไม้ทั้งคู่ และมีความแตกต่างที่อะซิติกแอซิดแบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาตาเลส ในขณะที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาตาเลส (Yamada, Hoshino, and Ishikawa, 1997)

เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่มีแมนนิทอลเป็นส่วนประกอบได้ เจริญเติบโตบนอาหารที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบและสร้างกรดจากกลูโคสได้ สังเกตได้จากการให้ผลบวกต่อการทดสอบการเจริญบนอาหาร GYPG ซึ่งมีกลูโคสและแคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) เป็นส่วนประกอบ เมื่อเชื้อใช้กลูโคสและเกิดการสร้างกรดจะทำให้ผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารละลาย เกิดเป็น clear zone รอบๆ โคโลนี

ส่วนความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาคีโตเจนเนซิสจากกลีเซอรอลนั้น ทุกสายพันธุ์ให้ผลบวก De Ley และ Frateur (1974) ได้จัด *Acetobacter* กลุ่มที่ให้ผลบวกต่อสมบัตินี้ให้เป็น *Acetobacter acetii* และแบ่งพวกที่สามารถผลิตเซลล์ลูโลสได้เป็น *Acetobacter acetii* subsp. *xylinum* ซึ่งต่อมา Holt และคณะ (1994) ตั้งชื่อใหม่เป็น *Acetobacter xylinum*

สำหรับความสามารถในการสร้างกรดและเซลล์ลูโลสจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ จะสังเกตุการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ คือ โบรโมครีซอลเพอร์เฟิล (bromocresol purple) ถ้าเชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ก็จะเจริญและสร้างกรดออกมาทำให้สีของโบรโมครีซอลเพอร์เฟิล ซึ่งมีช่วงความเป็นกรดต่างในการเปลี่ยนสีอยู่ในช่วง 6.8-5.2 เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (Asai, 1968) ส่วนการสร้างวุ้นเซลล์ลูโลส จะสังเกตุทั้งที่ผิวหน้าของอาหารเหลวและในอาหารเหลว เนื่องจากเชื้อบางสายพันธุ์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนบางชนิดในการสร้างวุ้นได้ แต่จะไม่ได้วุ้นที่มีลักษณะเป็นแผ่นหนาลอยอยู่ที่ผิวอาหารเหลว จะได้วุ้นที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมๆ คุ้มน้ำอยู่ภายใน เมื่อบีบน้ำออกจะได้เพียงเยื่อบางๆ ของเซลล์ลูโลสเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนบางชนิดเท่านั้นที่เหมาะสมในการสร้างวุ้นของเชื้อ และเชื้อแต่ละสายพันธุ์ก็สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกันด้วย (De Ley et al., 1984)

น้ำตาลที่เชื้อทุกสายพันธุ์สามารถใช้ในการสร้างกรดและสร้างเซลล์ูโลสได้ คือ กลูโคส ฟรุคโตส กาแลคโตส แมนนิทอล ซูโครสและไซโลส โดยที่เซลล์ูโลสที่ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส จะมีลักษณะเป็นแผ่นวุ้นหนาลอยอยู่ที่ผิวหน้าของอาหาร ในขณะที่เซลล์ูโลสที่ได้จากการใช้น้ำตาล ชนิดอื่นจะเป็นเส้นใยบางๆ ที่อุ้มน้ำอยู่เท่านั้น แสดงให้เห็นว่า กลูโคสและฟรุคโตสน่าจะเป็นแหล่ง คาร์บอนที่ดีในการสร้างเซลล์ูโลสสำหรับเชื้อ 3 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

### 5.3 ลักษณะการสร้างวุ้นเซลล์ูโลสของ *Acetobacter* sp.

ลักษณะการสร้างวุ้นของ *Acetobacter* sp. แต่ละสายพันธุ์เป็นสมบัติหนึ่งที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์นอกเหนือไปจากลักษณะโคโลนีและลักษณะทางชีวเคมี ลักษณะแรก ที่สังเกตได้อย่างชัดเจน คือ ความหนาและน้ำหนักเปียกของแผ่นวุ้นที่ได้จากการหมัก ซึ่งโดยทั่วไปใน อุตสาหกรรมการผลิตแผ่นวุ้นจะใช้เวลาในการหมักประมาณ 7-14 วัน (วรารุณี ครุสง, 2539) ใน การทดลองนี้จึงใช้ระยะเวลาในการหมัก 7 วัน จากตารางที่ 4.2 พบว่า *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ที่ สร้างแผ่นวุ้นที่มีความหนาและมีน้ำหนักเปียกมากที่สุด คือ TISTR 975 รองลงมา คือ TISTR 1037 และ TISTR 893 ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์ูโลสที่ได้ต่อน้ำหนักเปียกพบว่า วุ้นที่ได้จาก TISTR 975 นั้นมีปริมาณเซลล์ูโลสอยู่น้อยกว่าปริมาณเซลล์ูโลสในแผ่นวุ้นที่ได้จาก TISTR 893 แสดง ว่า แผ่นวุ้นที่ได้จาก TISTR 975 มีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่มากกว่าทำให้มีน้ำหนักมาก ในขณะที่ทำการ หั่นแผ่นวุ้นเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการหาปริมาณเซลล์ูโลสพบว่า แผ่นวุ้นที่ได้จากสายพันธุ์ TISTR 975 ให้น้ำหนักที่ต่ำที่สุด คือ มีความเหนียวนุ่มและเกาะตัวกันดีกว่า แผ่นวุ้นที่ได้จาก สายพันธุ์ TISTR 893 และ TISTR 1037 ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า *Acetobacter* sp. แต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตเส้นใย เซลล์ูโลสที่มีคุณภาพแตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากจำนวนโครงสร้างพอลิเมอร์และช่องว่างภายในแผ่น วุ้นจึงส่งผลถึงความหนาของแผ่นวุ้นที่ได้ (Valla, 1995)

จากรูปที่ 4.6 และ 4.8 พบว่า TISTR 975 ใช้น้ำตาลในปริมาณที่สูงกว่า TISTR 893 และ TISTR 1037 และปริมาณกรดที่สร้างขึ้นก็สูงกว่าด้วย จึงทำให้ผลผลิตเซลล์ูโลสที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ ต่ำที่สุด TISTR 1037 ใช้น้ำตาลสูงเป็นอันดับที่สองแต่สร้างกรดได้เท่าๆ กับ TISTR 893 น้ำตาลที่ใช้ อาจจะถูกนำไปใช้ในการผลิตสารอื่นนอกเหนือจากกรดและเซลล์ูโลส จึงทำให้ผลผลิตเซลล์ูโลสที่ได้ ต่อน้ำตาลที่ใช้ต่ำกว่าของ TISTR 893 ที่มีผลผลิตเซลล์ูโลสที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้สูงที่สุด ผลผลิตเซลล์ูโลสที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็น เซลล์ูโลสของเชื้อ ซึ่งจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 893 มี

ประสิทธิภาพสูงสุดในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเซลล์ลูโลส แต่เมื่อพิจารณาที่ความหนาของแผ่นวุ้นที่ได้กลับน้อยที่สุดซึ่งเหตุผลน่าจะเป็นดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

ในการเลือกสายพันธุ์ของ *Acetobacter* sp. เพื่อใช้ในการผลิตวุ้นเซลล์ลูโลสนั้นจะต้องพิจารณาว่าต้องการวุ้นที่ได้ไปใช้ในลักษณะใด เช่น ถ้าต้องการผลิตเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อาจจะต้องใช้สายพันธุ์ที่ผลิตแผ่นวุ้นที่ให้ความหนามาก มีน้ำหนักสูง ซึ่งก็จะต้องคำนึงถึงลักษณะเนื้อสัมผัสด้วย แต่ถ้าต้องการผลิตเพื่อให้ได้วุ้นที่มีปริมาณเซลล์ลูโลสสูงโดยไม่คำนึงถึงความหนาวุ้นก็ควรจะใช้สายพันธุ์ TISTR 893

#### 5.4 การเจริญเติบโตของ *Acetobacter* sp.

จากรูปที่ 4.10 พบว่า *Acetobacter* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ ทั้งที่เลี้ยงในภาวะนิ่งและภาวะเขย่า มีช่วงการเจริญในช่วง Log phase อยู่ระหว่างวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 โดยในการเลี้ยงเชื้อที่ภาวะเขย่าจะมีปริมาณเชื้อสูงกว่าในช่วง Log phase ทั้งนี้เนื่องจากการเขย่าจะทำให้เชื้อได้รับออกซิเจนมากกว่าการเลี้ยงแบบนิ่ง เชื้อจึงมีการเจริญได้มากกว่า แต่ถ้าวัดปริมาณวุ้นที่เชื้อผลิตในภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าจะพบว่าปริมาณน้อยกว่าวุ้นที่ได้จากการเลี้ยงแบบนิ่ง เนื่องจากเชื้อไม่จำเป็นต้องสร้างเซลล์ลูโลสเพื่อให้เกิดการลอยตัวของเซลล์ไปรับออกซิเจนที่ผิวหน้าของอาหาร แต่การเลี้ยงแบบเขย่าจะมีโอกาสทำให้เกิดเซลล์ที่ขาดสมบัติในการผลิตเซลล์ลูโลสเพิ่มมากขึ้น (Schramm and Hestrin, 1954) จึงเลือกใช้ภาวะในการเลี้ยงแบบนิ่งและแบบเขย่าเป็นปัจจัยหนึ่งในการเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาการแปรผันของเชื้อและทำการต่อเชื้อทุกๆ 3 วัน เหมือนกับการทดลองของ Schramm และ Hestrin (1954) ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้ออยู่ใน Log phase ด้วย

#### 5.5 การเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อ

การเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* เพื่อผลิตเซลล์ลูโลสสามารถทำได้ใน 2 ภาวะ คือ การเลี้ยงในภาวะนิ่งและการเลี้ยงในภาวะเขย่า ในภาวะนิ่ง เซลล์ของ *Acetobacter* sp. จะมาอยู่ที่บริเวณผิวหน้าของอาหารเหลวโดยการลอยตัวของแผ่นเซลล์ลูโลส ร่างแหของเซลล์ลูโลสสามารถลอยอยู่ที่ผิวหน้าของอาหารได้ด้วยการดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) ที่ได้จากการหายใจของเซลล์ ส่วนในภาวะเขย่า จะไม่ได้แผ่นเซลล์ลูโลสเหมือนกับในภาวะนิ่งเพราะเชื้อไม่จำเป็นต้องสร้างร่างแหเซลล์ลูโลสเพื่อให้เกิดการลอยตัวของเซลล์ไปสัมผัสกับออกซิเจน เนื่องจากในภาวะเขย่าเชื้อได้รับออกซิเจน

เพียงพอแล้ว ลักษณะของเซลล์โลสที่ได้จะเป็นทรงกลมหรือเป็นแฉกคล้ายรูปดาว ขนาดประมาณ 10 มิลลิเมตร (Schramm and Hestrin, 1954)

ในการทดลองจึงได้ทำการเลี้ยงเชื้อในภาวะนิ่งและภาวะเขย่าและต่อเชื้อทุกๆ 3 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง Log phase เพื่อดูผลของภาวะการเลี้ยงต่อการแปรผันของเชื้อ และทดลองเลี้ยงเชื้อในภาวะการต่อเชื้อปกติเพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อในการผลิตแผ่นวุ้นด้วย คือ เลี้ยงเชื้อสลับกันในอาหารแข็งและอาหารเหลวและต่อเชื้อทุกๆ 7 วัน

### 5.5.1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ภาวะนิ่ง

การวัด pH ปริมาณกรดและปริมาณน้ำตาลที่เชื้อใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นการติดตามการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นในการเลี้ยงแต่ละครั้งและเพื่อดูถึงความสัมพันธ์ต่อการแปรผันของเชื้อในกรณีที่เกิดการแปรผัน และการวัดการสร้างวุ้นทุกๆ 4 ครั้งของการต่อเชื้อเพื่อดูว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้ว เชื้อส่วนใหญ่มีสมบัติในการสร้างวุ้นเปลี่ยนไปหรือไม่ และได้สุ่มตัวอย่างเชื้อมา streak ลงบนอาหารแข็งด้วย เพราะบางครั้งเชื้อที่เกิดการแปรผันก็อาจจะปะปนอยู่กับเชื้อปกติ จะต้องพิจารณาที่ลักษณะของโคโลนีจึงจะเห็นความแตกต่าง จากรูปที่ 4.12 และ 4.13 พบว่าในแต่ละครั้งของการเลี้ยงเชื้อ เชื้อมีการเปลี่ยนแปลงในเรื่องของการสร้างกรดและการใช้น้ำตาลสูงมากแต่ก็เป็นไปในลักษณะเดียวกันในแต่ละครั้ง คือ TISTR 975 เป็นเชื้อที่สร้างกรดและใช้น้ำตาลสูงสุด ส่วนการสร้างกรดและการใช้น้ำตาลของ TISTR 893 และ TISTR 1037 มีความใกล้เคียงกัน

เมื่อพิจารณาการสร้างวุ้น จากรูปที่ 4.14-4.20 พบว่า เชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงสูงสุดในแต่ละครั้งของการวัด คือ TISTR 975 แต่แนวโน้มก็เป็นไปในลักษณะเดียวกัน คือ TISTR 975 เป็นเชื้อที่สร้างแผ่นวุ้นที่มีความหนาและน้ำหนักเปียกสูงที่สุด แต่แผ่นวุ้นที่ได้จะมีปริมาณเซลล์โลสต่ำที่สุด สร้างกรดและใช้น้ำตาลสูงที่สุด จึงทำให้ได้ผลผลิตเซลล์โลสต่อน้ำตาลที่ใช้ต่ำสุด ส่วน TISTR 893 สร้างวุ้นที่มีความหนาและน้ำหนักเปียกน้อยที่สุด แต่แผ่นวุ้นที่ได้มีปริมาณเซลล์โลสสูงที่สุด สร้างกรดและใช้น้ำตาลใกล้เคียงกับ TISTR 1037 แต่มีผลผลิตเซลล์โลสต่อน้ำตาลที่ใช้สูงที่สุด

ทำการเลี้ยงเชื้อในภาวะนิ่งเป็นเวลา 60 วัน ต่อเชื้อ 20 ครั้ง วัดการสร้างวุ้นและ streak เชื้อ 6 ครั้ง พบเชื้อที่โคโลนีมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม 1 สายพันธุ์ เป็นเชื้อที่ได้จาก TISTR 975 จึงตั้งชื่อว่า 975B ได้จากการสุ่มตัวอย่างเชื้อที่วัดการสร้างวุ้นครั้งที่ 5 หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลาประมาณ 48 วัน เพราะสังเกตเห็นว่า TISTR 975 สร้างวุ้นที่มีความหนาน้อยผิดปกติ จึงพบโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไปของ TISTR 975 ลักษณะโคโลนีของ 975B เมื่อเปรียบเทียบกับ TISTR



975 แสดงในรูปที่ 4.39 จะเห็นว่าโคโลนีของ 975B มีขนาดเล็กลงมากและไม่หนูนสูงเหมือนเดิม ลักษณะโคโลนีนี้เป็นลักษณะแรกที่เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายและบอกให้รู้ได้ว่าเชื้อเริ่มมีการแปรผัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Schramm และ Hestrin (1954)

### 5.5.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า

ทำการติดตามค่า pH ปริมาณกรดและปริมาณน้ำตาลที่ใช้ทุกครั้งของการเลี้ยงเชื้อ วัดการสร้างวุ้นและ streak เชื้อทุกๆ 4 ครั้งของการต่อเชื้อเหมือนกับการเลี้ยงในภาชนะนิ่ง ผลที่ได้คล้ายกับการเลี้ยงในภาชนะนิ่ง คือมีการเปลี่ยนแปลงสูงแต่ก็ยังคงเป็นไปในแนวโน้มเดียวกัน จากรูปที่ 4.22 และ 4.23 จะเห็นว่า TISTR 975 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างกรดและใช้น้ำตาลได้สูงที่สุด เมื่อพิจารณาการสร้างวุ้นก็เช่นเดียวกัน TISTR 975 ยังคงเป็นสายพันธุ์ที่สร้างวุ้นที่มีความหนาและน้ำหนักเปียกสูงที่สุด

เลี้ยงเชื้อในภาวะเขย่าเป็นเวลา 60 วัน ต่อเชื้อ 20 ครั้ง วัดการสร้างวุ้นและ streak เชื้อ 6 ครั้ง พบเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม 2 สายพันธุ์ เป็นเชื้อที่ได้จาก TISTR 975 และ TISTR 1037 จึงตั้งชื่อว่า 975A และ 1037A ตามลำดับ ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้จากการ streak เมื่อต่อเชื้อครั้งที่ 16 หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลาประมาณ 48 วัน ลักษณะโคโลนีของ 975A ต่างจากโคโลนีของ TISTR 975 ตรงที่โคโลนีเป็นเมือกเยิ้มและไม่หนูนสูงเหมือนเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4.39 ส่วนโคโลนีของ 1037A มีขนาดเล็กลงมากและมีสีเหลืองขึ้นเมื่อเทียบกับโคโลนีของ TISTR 1037 ดังแสดงในรูปที่ 4.40

### 5.5.3 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสลัดกับอาหารแข็ง

วัดการสร้างวุ้นและ streak เชื้อทุกๆ 4 ครั้งของการต่อเชื้อ ได้ผลที่มีแนวโน้มเหมือนกับการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาชนะนิ่งและภาวะเขย่า คือ TISTR 975 ยังคงเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตแผ่นวุ้นที่มีความหนาและน้ำหนักเปียกสูงที่สุด สร้างกรดและใช้น้ำตาลสูงที่สุด

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสลัดกับอาหารแข็งเป็นเวลา 84 วัน ทำการต่อเชื้อ 12 ครั้ง วัดการสร้างวุ้น 4 ครั้ง พบเชื้อที่โคโลนีมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม 1 สายพันธุ์ เป็นเชื้อที่ได้จาก TISTR 893 จึงตั้งชื่อว่า 893A ได้จากการ streak เชื้อเมื่อทำการต่อเชื้อครั้งที่ 10 หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลาประมาณ 70 วัน โคโลนีของ 893A ต่างจากโคโลนีของ TISTR 893 ตรงที่โคโลนีมีลักษณะแบนมาก ขอบไม่เรียบ สีเหลืองขึ้น ผิวมีความมันวาวมากกว่าเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4.38

จากการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อทั้ง 3 วิธีทำให้ได้เชื้อที่เกิดการแปรผัน 4 สายพันธุ์ คือ 893A 975A 975B และ 1037A ซึ่งเกิดจากการแปรผันของเชื้อตั้งต้นทั้ง 3 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่า วิธีการเลี้ยงเชื้อและการต่อเชื้อทั้ง 3 วิธีมีผลที่ทำให้เชื้อเกิดการแปรผัน และเชื้อตั้งต้นทั้ง 3 สายพันธุ์ก็เป็นเชื้อที่สามารถเกิดการแปรผันได้ โดย TISTR 975 น่าจะเป็นสายพันธุ์ที่มีโอกาสในการเกิดการแปรผันสูงสุด เพราะเกิดเชื้อแปรผันจากสายพันธุ์นี้ถึง 2 ชนิด คือ 975A และ 975B และการเลี้ยงเชื้อในภาวะเขย่า น่าจะเป็นวิธีที่ทำให้เกิดเชื้อแปรผันได้สูงสุด เพราะทำให้เกิดเชื้อแปรผันได้ 2 ชนิด คือ 975A และ 1037A

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในภาวะเขย่า เชื้อจะยังคงมีการสร้างเซลล์โลสแต่รูปแบบในการสร้างและลักษณะของเซลล์โลสที่ได้จะแตกต่างจากในภาวะนิ่ง โดยที่ในภาวะเขย่าเชื้อจะมีการสร้างเซลล์โลสลดลงและเซลล์โลสที่ได้จะมีการจับตัวกันเป็นก้อนหรือเป็นสายยาว และเมื่อทำการต่อเชื้อเป็นระยะเวลาสั้นจะเริ่มพบว่าเชื้อมีการสร้างเซลล์โลสลดลง เซลล์เริ่มมีการเจริญแบบกระจายซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Schramm และ Hestrin (1954) ที่พบการเจริญเช่นเดียวกันเมื่อทำการเลี้ยงในภาวะเขย่า และเมื่อทำการทดลองซ้ำโดยเริ่มจากเชื้อตั้งต้นที่ทดสอบแล้วว่าสามารถสร้างเซลล์โลสได้ดีก็ให้ผลเช่นเดิม คือ เชื้อเริ่มมีการสร้างเซลล์โลสได้น้อยลงเมื่อต่อเชื้อและเลี้ยงในภาวะเดิมหลายครั้งมากขึ้น การทดลองของ Valla และ Kjobbakken (1982) ให้ผลเหมือนกับของ Schramm และ Hestrin และพบว่าภาวะการเลี้ยงแบบเขย่า เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่ไม่สร้างเซลล์โลสมากกว่าเชื้อที่สร้างเซลล์โลส เพราะเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงมากกว่า 30 ชั่วโมง ปริมาณของเชื้อที่ไม่สร้างเซลล์โลสจะสูงกว่าเชื้อที่สร้างเซลล์โลส สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากว่า เชื้อที่สร้างเซลล์โลสเมื่อเพิ่มปริมาณจนถึงระดับหนึ่งจะเกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน จำนวนเซลล์ก็จะเพิ่มขึ้นน้อย ในขณะที่เชื้อที่ไม่สร้างเซลล์โลสจะมีการเจริญแบบกระจายต่อไป จึงเพิ่มจำนวนได้มากกว่า และเมื่อนำเชื้อที่ไม่สร้างเซลล์โลสจากการเลี้ยงที่ภาวะเขย่ามาทดลองเลี้ยงในภาวะนิ่ง พบว่าเชื้อกลับมามีการสร้างเซลล์โลสได้เหมือนเดิม แสดงให้เห็นว่า เชื้อที่ไม่ได้สร้างเซลล์โลสที่เกิดขึ้นเองจากการเลี้ยงนั้นสามารถกลับมาเกิดการสร้างเซลล์โลสได้ใหม่เมื่ออยู่ในภาวะที่เหมาะสม

จากการทดลองเมื่อเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อจนครบ 4 ครั้ง จะสุ่มตัวอย่างเชื้อที่เลี้ยงมา streak ลงบนอาหารแข็งเพื่อสังเกตลักษณะโคโลนีเปรียบเทียบกับโคโลนีของเชื้อตั้งต้น ถ้าพบลักษณะโคโลนีที่ผิดปกติก็จะนำโคโลนีนั้นไปทดสอบลักษณะอื่นๆ ต่อไป การใช้ลักษณะโคโลนีเป็นเกณฑ์ในการกำหนดการแปรผันของเชื้อเนื่องจากลักษณะโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไปย่อมแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงจากภายในเซลล์ของเชื้อเพียงปัจจัยเดียวเท่านั้น แต่ลักษณะการสร้างวุ้นที่เปลี่ยนแปลงอาจเกิดเนื่องจากปัจจัยด้านอาหารและภาวะแวดล้อมร่วมด้วย ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าถึงแม้ในการเลี้ยงเชื้อที่ภาวะเขย่าจะ

มีเชื้อที่ไม่สร้างเซลลูโลสอยู่ แต่เมื่อผสมตัวอย่างมา streak ดูลักษณะโคโลนี ในบางครั้งกลับไม่พบลักษณะโคโลนีที่ผิดปกติ เช่นเดียวกับการทดลองของ Valla และ Kjosbakken (1982) ที่พบว่า เชื้อที่ไม่สร้างเซลลูโลสในภาวะเขย่า เมื่อนำมา streak ดูลักษณะโคโลนี พบทั้งโคโลนีที่แตกต่างและไม่แตกต่างจากโคโลนีของเชื้อปกติอยู่ปะปนกัน ดังนั้นถึงแม้ว่าจะพบการเจริญแบบขุ่นในอาหารเหลวที่แสดงถึงการมีเชื้อที่ไม่สร้างเซลลูโลส แต่ก็อาจจะไม่พบลักษณะโคโลนีที่ผิดปกติก็ได้

แต่เชื้อแปรผันทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้จากการทดลองนี้มีลักษณะโคโลนีที่ผิดปกติจากลักษณะโคโลนีเดิมของเชื้อตั้งต้น จึงตั้งชื่อใหม่โดยให้คงชื่อเดิมของสายพันธุ์ตั้งต้นไว้ นอกจากนี้จะมีลักษณะโคโลนีที่ไม่เหมือนกับโคโลนีของเชื้อตั้งต้นแล้ว เมื่อทดสอบลักษณะทางชีวเคมีเปรียบเทียบกับเชื้อตั้งต้นก็ยังมีสมบัติบางอย่างที่เปลี่ยนไปด้วย จากตารางที่ 4.5 พบว่า สมบัติที่เชื้อแปรผันทั้ง 4 สายพันธุ์ยังคงเหมือนกับเชื้อตั้งต้น คือ ให้ผลบวกต่อการสร้างเอนไซม์คาตาเลส เจริญบนอาหาร MYP, MGYP และ GYPG ได้ ส่วนความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาคีโตเจนเนซิสจากกลีเซอรอลนั้น เชื้อแปรผันทั้ง 4 สายพันธุ์ให้ผลบวกยกเว้น 975A เป็นสายพันธุ์เดียวที่ไม่เกิดปฏิกิริยาคีโตเจนเนซิสจากกลีเซอรอล จากที่ De Ley และ Frateur (1974) เสนอไว้ว่า *Acetobacter acetii* subsp. *xylinum* จะให้ผลบวกต่อปฏิกิริยานี้ ต่อมา Navarro และ Komagata (1999) ทำการทดลองและพบว่า *Acetobacter xylinum* บางสายพันธุ์ก็ไม่เกิดปฏิกิริยาคีโตเจนเนซิสจากกลีเซอรอล และได้ทำการเปลี่ยนชื่อจาก *Acetobacter xylinum* เป็น *Gluconacetobacter xylinus* แต่โดยทั่วไปก็ยังคงเรียกชื่อชนิดนี้ว่า *Acetobacter xylinum* อยู่

สมบัติที่เชื้อแปรผันแตกต่างจากเชื้อตั้งต้นมากที่สุดก็คือ การสร้างกรดและเซลลูโลสจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น 893A สามารถสร้างกรดจากเอธานอลได้ในขณะที่ TISTR 893 ไม่สามารถสร้างได้ 893A 975A และ 975B สามารถสร้างกรดจากกลีเซอรอลได้ในขณะที่ TISTR 893 และ TISTR 975 ไม่สามารถสร้างได้ แต่ TISTR 1037 ที่เคยสร้างกรดจากกลีเซอรอลได้เมื่อเกิดการแปรผันเป็น 1037A กลับไม่สามารถสร้างกรดจากกลีเซอรอลได้ แสดงว่ามีเชื้อมีการแปรผันเกิดขึ้นลักษณะการสร้างกรดและเซลลูโลสจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ก็จะมีการเปลี่ยนแปลงไปด้วย เช่นเดียวกับการทดลองของ Steel และ Walker (1957b) ที่พบว่า เชื้อแปรผันที่ได้จากการทดลองมีสมบัติในการสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดต่างๆ เปลี่ยนไปจากเดิมและสมบัติทางชีวเคมีบางชนิดก็เปลี่ยนไปด้วย

การสร้างวุ้นของเชื้อที่เกิดการแปรผันเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อตั้งต้น จากตารางที่ 4.6 และ 4.8 พบว่า 893A และ 1037A เป็นเชื้อแปรผันที่สามารถสร้างวุ้นที่มีความหนาและน้ำหนักเปียกได้มากกว่าเชื้อตั้งต้น คือ TISTR 893 และ TISTR 1037 ตามลำดับ แต่ปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากแผ่นวุ้นต่อน้ำหนักเปียกลดลง ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลที่ใช้สูงขึ้น แสดงว่าน้ำตาลที่เขื่อนำไปใช้นั้นมีส่วนที่ถูก

นำไปสร้างเป็นเซลล์โกลสลดจากเดิม องค์ประกอบของแผ่นวุ้นที่ได้ก็ไม่เหมือนเดิม ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่เส้นใยของเซลล์โกลสมีการจัดเรียงตัวแบบใหม่ทำให้ได้แผ่นวุ้นที่หนาขึ้นโดยที่ใช้ปริมาณเซลล์โกลสน้อยลงหรือเชื้อใช้น้ำตาลในการสร้างเป็นพอลิแซคคาไรด์ชนิดอื่นและเป็นส่วนประกอบอยู่ในแผ่นวุ้น (Schramm and Hestrin, 1954) จากตารางที่ 4.7 พบว่า 975A และ 975B สร้างแผ่นวุ้นที่มีความหนาและน้ำหนักเปียกน้อยลงเมื่อเทียบกับ TISTR 975 975A ใช้น้ำตาลมากขึ้นแต่ปริมาณเซลล์โกลสที่ได้ในแผ่นวุ้นน้อยลง ปริมาณกรดที่สร้างยังคงเท่าเดิม แสดงว่าน้ำตาลถูกนำไปใช้การสร้างเป็นเซลล์โกลสได้น้อยลงและถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นแทน เช่น อาจจะใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างเซลล์ใหม่ ในขณะที่ 975B ใช้น้ำตาลได้น้อยลง ปริมาณเซลล์โกลสที่ได้ในแผ่นวุ้นและปริมาณกรดที่สร้างก็น้อยลง แสดงว่าเชื้อมีความสามารถจำกัดในการใช้น้ำตาลหรือเชื้ออาจจะมีการเจริญที่น้อยลง

การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวทั้งในภาวะนิ่งและภาวะเขย่าทำให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเชื้อได้ โดยวัดค่า pH ปริมาณกรดและปริมาณน้ำตาลที่เชื้อใช้ โดยพบว่าการเลี้ยงที่ภาวะเขย่า เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์จะมีการสร้างกรดและใช้น้ำตาลในปริมาณที่สูงกว่าการเลี้ยงในภาวะนิ่ง ทั้งนี้เพราะในภาวะเขย่าเชื้อมีการเจริญเติบโตสูงกว่าในภาวะนิ่งนั่นเองดังแสดงในรูปที่ 4.10 ปริมาณเชื้อมีมากกว่าจึงทำให้ใช้น้ำตาลและผลิตกรดได้มากกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในการเลี้ยงที่ภาวะเขย่าเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างสูง น่าจะมีโอกาสที่จะเกิดเชื้อแปรผันได้จากการเลี้ยงที่ภาวะนี้

เมื่อนำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มาวัดลักษณะการสร้างวุ้นหลังจากต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้ง พบว่าในแต่ละครั้งที่ทำการวัด เชื้อมีสมบัติหลายชนิดที่เกิดการเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยดังแสดงในตารางที่ 4.4 แล้วเปรียบเทียบกับสมบัติตั้งต้น พบว่าสมบัติที่มีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างสูงจากเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ การใช้น้ำตาลที่เพิ่มขึ้นในขณะที่ปริมาณเซลล์โกลสที่ได้ค่อนข้างคงที่ จึงส่งผลให้การผลิตเซลล์โกลสลดลง จากผลการทดลองที่ได้นี้พอจะบอกได้ว่า การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ การใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเซลล์โกลส ซึ่งเมื่อพิจารณาการผลิตเซลล์โกลสของเชื้อแปรผันทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้ ก็พบว่า เชื้อแปรผัน 4 สายพันธุ์ล้วนแล้วแต่มีการผลิตเซลล์โกลสลดลงเมื่อเทียบกับเชื้อตั้งต้น

## 5.6 ลักษณะทางพันธุกรรมของ *Acetobacter* sp.

ลักษณะแรกที่สังเกตเห็นได้ถึงการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *Acetobacter* sp. ที่ใช้ในการทดลอง คือ ลักษณะโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเป็นลักษณะทางกายภาพ ลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมของเชื้อ (Saxena and Brown, 1989) จึงทำการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของ *Acetobacter* sp. ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองโดยเทคนิค RFLP และใช้เรสทริกชันเอนไซม์ 8 ชนิด ในการตัดสายดีเอ็นเอ แล้วสังเกตลักษณะแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล ถ้าพบว่ามีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจาก *Acetobacter* sp. 7 สายพันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกัน แสดงว่า มีการเรียงตัวของลำดับเบสที่แตกต่างกันในสายดีเอ็นเอของ *Acetobacter* sp. แต่ละสายพันธุ์

รูปที่ 4.46 แสดงแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่แยกได้จาก *Acetobacter* sp. ทั้ง 7 สายพันธุ์ โดยมี  $\lambda$ -ดีเอ็นเอ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า ดีเอ็นเอจาก *Acetobacter* sp. ทั้ง 7 สายพันธุ์ที่แยกได้ มีขนาดใหญ่กว่า 23.4 กิโลเบส เมื่อนำดีเอ็นเอจากทั้ง 7 สายพันธุ์มาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 8 ชนิด คือ *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *NdeI*, *PvuII*, *SaI* และ *XbaI* พบว่า แถบดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์บนอะกาโรสเจลที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกัน มีลักษณะแตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอของทั้ง 7 สายพันธุ์ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.47-4.54 จากผลการทดลองที่ได้นี้น่าจะบอกได้ว่า (1) ลักษณะโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไปของ *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ตั้งต้นนั้น เป็นเพียงแค่การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเชื้อโดยไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรม (2) การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเชื้อเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรม แต่การใช้เทคนิค RFLP ประกอบกับเรสทริกชันเอนไซม์ 8 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง ยังไม่สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงนั้นได้

แต่จากการทดลองของ Coucheron ในปี 1991 พบว่า ในสายของดีเอ็นเอที่แยกจาก *Acetobacter xylinum* ที่เป็น spontaneous  $Cel^+$  (*Acetobacter xylinum* ที่เกิดการแปรผันด้วยตัวเอง กลายเป็นเซลล์ที่ไม่สามารถผลิตเซลลูโลสได้หรือผลิตได้น้อยลง) มีส่วนที่เรียกว่า insertion sequence (IS) แทรกอยู่

insertion sequence เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่สามารถอยู่ได้ในตำแหน่งใดๆ ของจีโนม (genome) ของเซลล์และสามารถแทรกตัวเข้าไปอยู่ในสายของดีเอ็นเอหรือพลาสมิด (plasmid) ได้ โดยไม่มีตำแหน่งเฉพาะ เมื่อ insertion sequence แทรกตัวอยู่ในสายดีเอ็นเอของ *Acetobacter*

*xylinum* จะทำให้ลำดับเบสของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งผู้ทดลองคาดว่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ *Acetobacter xylinum* เกิดการแปรผันได้ง่ายซึ่งส่วนหนึ่งเกิดเป็น Cel<sup>+</sup>

ในเซลล์ของ *Acetobacter xylinum* มี insertion sequence อยู่หลายชนิด ในการทดลองของ Iversen และคณะในปี 1994 พบ insertion sequence อีกชนิดหนึ่งที่แทรกตัวอยู่ในสายดีเอ็นเอของ *Acetobacter xylinum* และทำให้เกิดเป็น Cel<sup>+</sup> เช่นเดียวกัน ซึ่ง insertion sequence ที่พบในการทดลองนี้เป็นจำพวกเดียวกับ insertion sequence ที่พบในการทดลองของ Coucheron ในปี 1991 แต่มีขนาดแตกต่างกันและมีตำแหน่งในการแทรกตัวในสายดีเอ็นเอแตกต่างกันด้วย insertion sequence ที่พบใน *Acetobacter xylinum* ได้ถูกนำมาศึกษาถึงขนาด การจัดเรียงตัวของลำดับเบส และจำนวนที่มีอยู่ในเซลล์และพบว่า insertion sequence ไม่ได้แทรกตัวอยู่ในทุกสายดีเอ็นเอของ spontaneous Cel<sup>+</sup> ที่เกิดขึ้นจากการทดลอง (Coucheron, 1993)

สิ่งที่น่าสังเกตจากผลการทดลองที่ได้ คือ ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันของ *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ตั้งต้นไม่ว่าจะตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดใด ซึ่งเหมือนกับสายพันธุ์ที่เกิดจากการแปรผันทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้แถบดีเอ็นเอเหมือนกับแถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ตั้งต้น จึงคาดว่า อาจจะเป็นไปได้ที่ *Acetobacter* sp. 3 สายพันธุ์ตั้งต้นที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เป็นเชื้อแปรผันที่เกิดจากเชื้อตั้งต้นที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันจึงมีลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ตัดได้เหมือนกัน

## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการทดลอง

1. *Acetobacter* sp. แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและการสร้างวุ้นเซลลูโลส
2. *Acetobacter* sp. TISTR 975 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างวุ้นที่มีความหนามากที่สุดคือ 1.04 เซนติเมตร แต่มีการผลิตเซลลูโลสต่ำที่สุดคือ 27.88% ในขณะที่ TISTR 893 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างวุ้นที่มีความหนาน้อยที่สุดคือ 0.36 เซนติเมตรแต่มีการผลิตเซลลูโลสสูงที่สุดคือ 35.27%
3. วิธีการเลี้ยงเชื้อและการต่อเชื้อทั้ง 3 วิธีทำให้เกิดเชื้อแปรผัน และการเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อในภาวะเขย่ามีผลทำให้เชื้อเกิดการแปรผันมากที่สุด
4. เชื้อ *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ที่เกิดการแปรผันมากที่สุด คือ TISTR 975
5. เชื้อที่เกิดจากการแปรผันจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและการสร้างวุ้นเปลี่ยนไปจากลักษณะเดิมของเชื้อตั้งต้น
6. เชื้อแปรผันทุกสายพันธุ์มีการผลิตเซลลูโลสลดลงเมื่อเทียบกับเชื้อตั้งต้นโดย 893A เป็นเชื้อแปรผันที่มีการผลิตเซลลูโลสลดลงมากที่สุดคือ ลดลงถึง 22.30% ในขณะที่ 1037A เป็นเชื้อแปรผันที่มีการผลิตเซลลูโลสลดลงน้อยที่สุดคือ ลดลงเพียง 13.59%
7. *Acetobacter* sp. ทั้ง 7 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางด้านลักษณะพันธุกรรม เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค RFLP โดยใช้เรสทริกชันเอนไซม์ 8 ชนิดที่กล่าวมา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของแผ่นวุ้นที่ได้จาก *Acetobacter* sp. แต่ละสายพันธุ์ โดยการทดสอบลักษณะเนื้อสัมผัสและการศึกษาโครงสร้างภายในของแผ่นวุ้น
2. ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *Acetobacter* sp. ควรจะมีการทดสอบเพิ่มเติมนอกเหนือจากลักษณะที่ได้ทดสอบในการทดลองเพราะอาจจะทำให้พบลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างแต่ละสายพันธุ์เพิ่มขึ้น
3. ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและจำนวนครั้งในการต่อเชื้อ ควรจะเพิ่มให้มากขึ้นจากที่ใช้ในการทดลอง เพื่อศึกษาถึงโอกาสในการเกิดการแปรผันของเชื้อ
4. เชื้อที่เกิดการแปรผันแล้ว ควรจะนำมาเลี้ยงและต่อเชื้อในลักษณะเดิมเพื่อศึกษาถึงความคงตัวเชื้อและความเป็นไปได้ในการกลับไปมีลักษณะเดิมหรือแปรผันเป็นลักษณะใหม่
5. การศึกษาถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *Acetobacter* sp. ควรเพิ่มชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์ให้มากขึ้น หรือใช้เทคนิคอื่นเพิ่มเติมนอกเหนือจาก RFLP



## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- ณัฐพร สุนทรวิจารณ์. 2534. เรสทริกชันแฟรกเมนต์เล็งก์โพลีโมर्फิซึมของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Bradyrhizobium japonicum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วราวุฒิ ครูสง. 2539. วันมะพร้าว: การผลิตและการใช้ประโยชน์. ในเอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “คาร์โบไฮเดรต: ปัจจุบันและอนาคต”, หน้า 32-38. 8-10 พฤษภาคม 2539 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
- ศิริพร สัทธิประณีต. 2531. พันธุวิศวกรรม: ปฏิบัติการเบื้องต้น. หน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมคิด ธรรมรัตน์. 2531. การผลิตวันน้ำมะพร้าวและการแปรรูป. วารสารอาหาร 18(4): 250-262.
- สุนทร ปิยะโชคณากุล. 2539. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุวรรณ สุทธิสุนนท์. 2535. เรสทริกชันแฟรกเมนต์เล็งก์โพลีโมर्फิซึมของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน ที่อยู่ร่วมกับข้าว (*Oryza sativa* L.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาษาอังกฤษ

- Alaban, C.A. 1962. Studies on the optimum conditions for nata de coco bacterium of nata formation in coconut water. Phil. Jour. Agric. 45(9): 490-516.
- Arunoros, U. 1976. Nata de coco. Food Sci. J. Faculty of Agri. Kasetsart University. 8: 19-21.
- Asai, T., Iizuka, H., and Komagata, K. 1964. The flagellation and taxonomy of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter* with reference to the existence of intermediate strains. J. Gen. Appl. Microbiol. 10(2): 95-126.
- Asai, T. 1968. Acetic acid bacteria classification and biochemical activities. Tokyo: University of Tokyo Press.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Official methods of analysis. 15<sup>th</sup> ed. Vol. 2. Virginia: The Association of Official Analytical Chemists.
- Breed, R. S., Murray, E. G. D., and Smith, N. R. 1957. Bergey's manual of determinative bacteriology. 7<sup>th</sup> ed. Baltimore: The Williams and Wilkins. pp. 183-189.
- Coucheron, D.H., 1991. An *Acetobacter xylinum* insertion sequence element associated with inactivation of cellulose production. J. Bacteriol. 173(18): 5723-5731.
- Coucheron, D. H., 1993. A family of IS1031 elements in the genome of *Acetobacter xylinum*: nucleotide sequences and strain distribution. Mol. Microbiol. 9(1): 211-218
- De Ley, J., and Frateur, J. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8<sup>th</sup> ed. Baltimore: The Williams and Wilkins. pp. 276-278.
- De Ley, J., Swings, J., and Gossele, F. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Baltimore: The Williams and Wilkins. pp. 268-274.
- Dubois, M., Gilles, K., A., Hamilton, J., K., Rebers, P., A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28(3): 350-356.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: The Williams and Wilkins. pp. 71-126.

- Ishikawa, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T., and Yoshinaga, F. 1995. Increase in cellulose production by sulfaguanidine-resistant mutants derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. Biosci. Biotech. Biochem. 59(12): 2259-2262.
- Iversen, T. G., Standal, R., Pedersen, T., and Coucheron, D. H. 1994. IS1032 from *Acetobacter xylinum*, a new mobile insertion sequence. Plasmid. 32: 46-54.
- Komagata, K. 1975. In Hasegawa, T. (ed.), Classification and identification of microorganisms. Tokyo: University of Tokyo Press.
- Masaoka, S., Ohe, T., and Sakota, N. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. J. Ferment. Bioeng. 75(1): 18-22.
- Navarro R. R., and Komagata K. 1999. Differentiation of *Gluconacetobacter liquefaciens* and *Gluconacetobacter xylinus* on the basis of DNA base composition, DNA relatedness, and oxidation products from glucose. J. Gen. Appl. Microbiol. 45: 7-15.
- Oikawa, T., Morino, T., and Ameyama, M. 1995. Production of cellulose from D-arabitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. Biosci. Biotech. Biochem. 59(8): 1564-1565.
- Ross, P., Mayer, R., and Benziman, M. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Microbiol. Rev. 55: 35-58.
- Saxena, I. M., and Brown, R., M., J., "Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: a genetic approach," in Cellulose and wood chemistry and technology, ed Schuerch, C. (NY: John Wiley & Sons, 1989), pp. 537-557.
- Schell, J., and De Ley, J. 1962. Variability of acetic acid bacteria. Antonie v. Leeuwenhoek. 28: 445-465.
- Schramm, M., and Hestrin, S. 1954. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid of a culture of *Acetobacter xylinum*. J. Gen. Microbiol. 11: 123-129.
- Steel, R., and Walker, T. K. 1957a. Celluloseless mutants of certain *Acetobacter* species. J. Gen. Microbiol. 17: 12-18.
- Steel, R., and Walker, T. K. 1957b. A comparative study of cellulose-producing cultures and celluloseless mutants of certain *Acetobacter* spp. J. Gen. Microbiol. 17: 445-452.
- Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T., and Horinouchi, S. 1996.

- Characterization of the biosynthesis pathway of cellulose from glucose and fructose in *Acetobacter xylinum*. Biosci. Biotech. Biochem. 60(8): 1377-1379.
- Valla, S., "Microorganisms for cellulose production," in Food biotechnology, eds. Hui, Y., H., and Khachatourians G., G. (NY: VCH, 1995), pp. 471-494.
- Valla, S., and Kjosbakken, J. 1982. Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*. J. Gen. Microbiol. 128: 1401-1408.
- Watanabe, K., and Yamanaka, S. 1995. Effects of oxygen tension in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture conditions. Biosci. Biotech. Biochem. 59: 65-68.
- Wulf, P. D., Joris, K., and Vandamme, E. J. 1996. Improved cellulose formation by an *Acetobacter xylinum* mutant limited in (keto)gluconate synthesis. J. Chem. Tech. Biotechnol. 67: 376-380.
- Yamada, Y., Hoshino, K., and Ishikawa, T. 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. Biosci. Biotech. Biochem. 61(8): 1244-1251.
- Yoshinaga, F., Tonouchi, N., and Watanabe, K. 1997. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. Biosci. Biotech. Biochem. 61(2): 219-224.

## ภาคผนวก ก

### 1. สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1.1 อาหารเหลวน้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวแก่ กรอง ต้มให้เดือดและชันไขมันออก	1	ลิตร
น้ำตาลทราย	50	กรัม
แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.5	กรัม

ปรับให้มีค่าความเป็นกรดต่างเป็น 5 ด้วยกรดอะซิติก  
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ  $121^\circ\text{C}$  ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 1.2 อาหารแข็งน้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวแก่ กรอง ต้มให้เดือดและชันไขมันออก	1	ลิตร
น้ำตาลทราย	50	กรัม
แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ปรับให้มีค่าความเป็นกรดต่างเป็น 5 ด้วยกรดอะซิติก  
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ  $121^\circ\text{C}$  ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 1.3 อาหารแข็ง GYPG

กลูโคส	10	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5	กรัม
เปปโตเน	10	กรัม
กลีเซอรอล	10	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO <sub>3</sub> )	3	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 1.4 อาหารแข็ง MYP (mannitol agar)

แมนนิทอล	25	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5	กรัม
เปปโตเน	5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 1.5 อาหารแข็ง MGYG (mannitol-glucose agar)

แมนนิทอล	20	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5	กรัม
เปปโตเน	5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 1.6 อาหารแข็ง GGY

กลีเซอรอล	10	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
ผงสก็ดยีสต์	5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 1.7 อาหารเหลว CBY

แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	10	กรัม
โบรโมครีซอลเพอร์เพิล (bromocresol purple)	0.02	กรัม
ผงสก็ดยีสต์	5	กรัม
น้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ ได้แก่ กลูโคส เอธานอล ฟรุคโตส กาแลคโตส กลีเซอรอล มอลโตส แมนนิทอล ซอร์บิทอล ซูโครส และไซโลส

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาลดอุณหภูมิโดยแช่ในน้ำเย็นทันที

## 2. การทดสอบลักษณะของเชื้อ

## 2.1 การย้อมสีโดยวิธีแกรม (Gram's stain)

สารเคมี - แกรมคริสตัลไวโอเลต (Gram's crystal violet) ประกอบด้วย

สารละลาย A : คริสตัลไวโอเลต	2	กรัม
เอธานอล (95%)	20	มิลลิลิตร
สารละลาย B : แอมโมเนียมออกซาลेट	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน

- แกรมไอโอดีน (Gram's iodine) ประกอบด้วย

ไอโอดีน	1	กรัม
โปแตสเซียมไอโอไดด์	2	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ผสมไอโอดีนและโปแตสเซียมไอโอไดด์ในโถรง บดให้เข้ากัน ค่อยๆ เติมน้ำกลั่น  
ทีละน้อยจนครบ 300 มิลลิลิตรแล้วผสมให้เข้ากัน

- แกรมแซฟฟรานิน (Gram's saffranin) ประกอบด้วย

แซฟฟรานิน	0.25	กรัม
เอธานอล (95%)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายแซฟฟรานินในเอธานอล เติมน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรอง

- วิธีการ
- กระจายเชื้อบนแผ่นสไลด์ ทำให้แห้งในอากาศแล้วผ่านเปลวไฟเพื่อ fix เซลล์
  - ย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลตนาน 1 นาที
  - ล้างด้วยน้ำกลั่น
  - ย้อมด้วยแกรมไอโอดีนนาน 1 นาที
  - ล้างสีออกโดยใช้เอธานอล 95%
  - ย้อมด้วยสีแซฟฟรานินนาน 30 วินาที
  - ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วซับให้แห้ง
  - ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

## 2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส

สารเคมี - สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3% ประกอบด้วย

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ )	3	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา

- วิธีการ
- เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง GYPG บ่มที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}C$  เป็นเวลา 7 วัน
  - หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3% ลงบนโคโลนีเชื้อ
  - ถ้าพบว่ามีฟองก๊าซเกิดขึ้น แสดงว่าให้ผลบวก คือ มีการสร้างเอนไซม์คาตาเลส
  - ถ้าไม่พบฟองก๊าซ แสดงว่าให้ผลลบ คือ ไม่มีการสร้างเอนไซม์คาตาเลส



### 2.3 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาคีโตเจนเนซิสจากกลีเซอรอล

สารเคมี - สารละลาย A ประกอบด้วย

คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	34.64	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

- สารละลาย B ประกอบด้วย

โซเดียมโปแตสเซียมทาทเรต	173	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ )	50	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

นำสารละลาย A และ สารละลาย B ผสมกันในอัตราส่วนที่เท่ากันได้เป็น

สารละลายเฟห์ลิง (Fehling's solution) ก่อนนำมาใช้

วิธีการ - เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง GGY บ่มที่อุณหภูมิ  $30^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 7 วัน

- หยดสารละลายเฟห์ลิงลงบนโคโลนีเชื้อ

- ถ้าพบว่ามีสีส้มเกิดขึ้นรอบๆ โคโลนี แสดงว่าให้ผลบวก คือ มีการเกิดปฏิกิริยาคีโตเจนเนซิสจากกลีเซอรอล ถ้าไม่พบสีส้มเกิดขึ้นรอบๆ โคโลนี แสดงว่าให้ผลลบ คือ ไม่มีการเกิดปฏิกิริยาคีโตเจนเนซิสจากกลีเซอรอล

## ภาคผนวก ข

### 1. การหาปริมาณเซลลูโลสในแผ่นวุ้น (Watanabe and Yamanaka, 1995)

- วิธีการ
- ชั่งน้ำหนักเปียกของแผ่นวุ้นหลังจากวางแผ่นวุ้นบนตะแกรงเป็นเวลา 5 นาที
  - หั่นแผ่นวุ้นเป็นชิ้นเล็กๆ
  - ต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4% เป็นเวลา 20 นาที เพื่อไล้กรดและกำจัดเซลลูโลสในแผ่นวุ้น
  - ล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้งและแช่ในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5% นาน 1 ชั่วโมง
  - ล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้งเพื่อกำจัดกรดและล้าง
  - อบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 1 วัน
  - ชั่งน้ำหนักแห้งที่ได้

$$\text{ปริมาณเซลลูโลส (cellulose content)} = \frac{(\text{น้ำหนักแห้ง} \times 100)}{\text{น้ำหนักเปียก}}$$

### 2. การหาปริมาณกรดทั้งหมด (total acid) (ปรับปรุงจาก AOAC, 1990)

- สารเคมี
- น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เตรียมโดยนำน้ำกลั่นมาต้มจนเดือดนาน 20 นาที
  - สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล เตรียมจากโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ที่เติมน้ำกลั่นปลอดคาร์บอนไดออกไซด์จนครบ 1 ลิตร เก็บในขวดแก้วที่กันคาร์บอนไดออกไซด์และทึบแสง ก่อนใช้ต้องนำมาหาความเข้มข้นมาตรฐานที่แน่นอน
- การหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ทำโดยชั่งโปแตสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต ( $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ ) ที่อบที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง อย่างละเอียดประมาณ 0.3 กรัม เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 90-100 มิลลิลิตร เมื่อโปแตสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลตละลาย จึงเติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด แล้วไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (นอร์มอล)} = \frac{\text{กรัมโปแตสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต} \times 1,000}{\text{มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์} \times 204.229}$$

- สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ชั่งฟีนอล์ฟทาลีน 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95%

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการ - ใช้ตัวอย่างอาหารเหลว น้ำมะพร้าว 10 มิลลิลิตร

- เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด

- ไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่รู้ความเข้มข้นแน่นอนจนกระทั่งถึงจุดยุติ จะเห็นสารละลายเป็นสีชมพู

- คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (acid content)} = (N \times V \times 60.1 \times 100) / (10 \times 1,000)$$

โดย N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

V = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรต

### 3. การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริกแอซิด (phenol-sulphuric acid)

(Dubois et al., 1956)

สารเคมี - สารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5% (w/v)

- กรดซัลฟูริกเข้มข้น

- สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.03-0.15 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตร

- สารละลายตัวอย่างอาหารเหลว น้ำมะพร้าว ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการ - ผสมสารละลายกลูโคสมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายฟีนอล 0.5 มิลลิลิตร

- เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย โดยเติมลงบนผิวหน้าของสารละลายโดยตรงอย่างรวดเร็ว ไม่ให้กรดสัมผัสกับผนังของหลอด

- ปล่อยให้สารละลายในหลอดทิ้งไว้หนึ่งๆ ประมาณ 10 นาที จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 30 นาที

- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

- คำนวณปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐาน

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เชื้อใช้} = \frac{(\text{ปริมาณน้ำตาลตั้งต้น} - \text{ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่}) \times 100}{\text{ปริมาณน้ำตาลตั้งต้น}}$$

(sugar consumption)

ปริมาณน้ำตาลตั้งต้น

## ภาคผนวก ค

### 1. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ

#### 1.1 Tris-HCl 1 โมลาร์ (pH 7.6)

ละลาย Tris base 1.21 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ประมาณ 0.6 มิลลิลิตร ลงไป ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.6 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 1.2 EDTA 0.5 โมลาร์ (pH 8)

ละลาย disodium ethylene diamine tetraacetate.2H<sub>2</sub>O (EDTA) 1.861 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร คนให้ละลายมากที่สุด ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 8 โดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 0.2 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 1.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.922 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 1.4 สารละลายซูโครส 25%

ละลายซูโครส 12.5 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 1.5 SET buffer ประกอบด้วย

สารละลายซูโครส 25%	40	มิลลิลิตร
Tris-HCl 1 โมลาร์ pH 7.6	2.5	มิลลิลิตร
EDTA 0.5 โมลาร์	5	มิลลิลิตร

ปรับให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

## 1.6 โซเดียมอะซิเตท 1 โมลาร์ (pH 7.4)

ละลายโซเดียมอะซิเตท ( $\text{Na-acetate} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 1.36 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.4 โดยการเติมกรดอะซิติก ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ  $121^\circ\text{C}$  ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 1.7 Rnase buffer ประกอบด้วย

โซเดียมอะซิเตท 1 โมลาร์ pH 7.4	1	มิลลิลิตร
EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8	6	ไมโครลิตร

ปรับให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

## 1.8 TEN buffer ประกอบด้วย

Tris-HCl 1 โมลาร์ pH 7.6	0.1	มิลลิลิตร
EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8	0.02	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์	0.02	มิลลิลิตร

ปรับให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

## 1.9 ไลโซไซม์ (lysozyme)

ละลายไลโซไซม์ 5 มิลลิกรัม ใน TEN buffer 1 มิลลิลิตร เตรียมก่อนการใช้

## 1.10 โปรเนส (pronase)

ละลายโปรเนส 2 มิลลิกรัม ใน TEN buffer 1 มิลลิลิตร อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที เตรียมก่อนการใช้

## 1.11 SDS 25%

ละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate) 2.5 กรัม ในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 68°C เพื่อช่วยให้การละลายเร็วขึ้น ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร

## 1.12 TE buffer ประกอบด้วย

Tris-HCl 1 โมลาร์ pH 8 0.1 มิลลิลิตร

EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8 0.02 มิลลิลิตร

ปรับให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

## 1.13 10X TBE

ละลาย Tris base 10.8 กรัม กรดบอริก (boric acid) 5.5 กรัม และ EDTA 0.93 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนใช้เจือจางให้เป็น 1X TBE ด้วยน้ำกลั่น

## 1.14 tracking dye

ละลายบรอมฟินอลบลู (bromphenol blue) 2.5 มิลลิกรัม ไฟคอลล์ 400 (ficoll 400) 4 กรัม และ SDS 50 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร

## 1.15 DNA staining solution

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 2.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาล

## 1.16 อะกาโรสเจล 0.8%

ชั่งอะกาโรสเจล (agarose gel) 0.4 กรัม เติม 1X TBE 50 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดพร้อมคนเป็นระยะจนได้สารละลายใส ตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 50°C ก่อนนำไปเทลงในแชมเบอร์ (chamber) เมื่ออะกาโรสเจลแข็งตัว เท 1X TBE ให้ท่วมแผ่นอะกาโรสเจล

2. ตำแหน่งการตัดลำดับเบสของเอนไซม์

เอนไซม์	อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา (°C)	ตำแหน่งการตัดเบส
<i>Bam</i> HI	37	5'---G↓GATCC---3' 3'---CCTAG↑G---5'
<i>Eco</i> RI	37	5'---G↓AATTC---3' 3'---CTTAA↑G---5'
<i>Hind</i> III	37	5'---A↓AGCTT---3' 3'---TTCGA↑A---5'
<i>Kpn</i> I	37	5'---GGTAC↓C---3' 3'---C↑CATGG---5'
<i>Nde</i> I	37	5'---CA↓TATG---3' 3'---GTAT↑AC---5'
<i>Pvu</i> II	37	5'---CAG↓CTG---3' 3'---GTC↑GAC---5'
<i>Sal</i> I	37	5'---G↓TCGAC---3' 3'---CAGCT↑G---5'
<i>Xba</i> I	37	5'---T↓CTAGA---3' 3'---AGATC↑T---5'

## ภาคผนวก ง

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ง.1 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนารู้น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้และการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 893 TISTR 975 และ TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวหมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

SOV	df	MS						
		Thickness	Wet weight	pH	Acid content	Cellulose content	Sugar consumption	Cellulose production
Treatment	2	0.609*	431.807*	0.094*	0.011*	0.980*	333.632*	71.881*
Error	12	0.003	1.247	0.004	0.000	0.006	0.597	6.645

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



ตารางที่ ง.2 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหารและปริมาณน้ำตาลที่ใช้ โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 893 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงในภาชนะ

SOV	df	MS		
		pH	Acid content	Sugar consumption
Treatment	19	0.035*	0.001*	7.199*
Error	20	0.002	0.000	0.621

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.3 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหารและปริมาณน้ำตาลที่ใช้ โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 975 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงในภาชนะ

SOV	df	MS		
		pH	Acid content	Sugar consumption
Treatment	19	0.037*	0.001*	18.241*
Error	20	0.001	0.000	0.510

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.4 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหารและปริมาณน้ำตาลที่ใช้ โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงในภาชนะนิ่ง

SOV	df	MS		
		pH	Acid content	Sugar consumption
Treatment	19	0.040*	0.001*	8.997*
Error	20	0.003	0.000	0.289

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.5 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาน้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้และการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 893 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำกรเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาชนะนิ่ง

SOV	df	MS						
		Thickness	Wet weight	pH	Acid content	Cellulose content	Sugar consumption	Cellulose production

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Treatment	5	0.011*	7.521*	0.074*	0.001*	0.353*	17.266*	94.686*
Error	24	0.001	0.623	0.003	0.000	0.024	1.320	8.120

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ 6 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาแน่น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้และการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 975 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำกรเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาชนะนี้

SOV	df	MS						
		Thickness	Wet weight	pH	Acid content	Cellulose content	Sugar consumption	Cellulose production
Treatment	5	0.121*	70.581*	0.042*	0.006*	0.721*	78.122*	119.296*
Error	24	0.003	1.980	0.006	0.000	0.031	3.215	4.671

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.7 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาน้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้และการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำกรเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาชนะนี้

SOV	df	MS						
		Thickness	Wet weight	pH	Acid content	Cellulose content	Sugar consumption	Cellulose production
Treatment	5	0.085*	50.990*	0.133*	0.003*	1.361*	15.276*	395.512*
Error	24	0.001	0.783	0.003	0.000	0.025	1.183	4.243

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.8 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหารและปริมาณน้ำตาลที่ใช้ โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 893 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงในภาวะเขย่า

SOV	df	MS		
		pH	Acid content	Sugar consumption

Treatment	19	0.073*	0.002*	8.527*
Error	20	0.004	0.000	0.619

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.9 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหารและปริมาณน้ำตาลที่ใช้ โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 975 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงในภาวะเขย่า

SOV	df	MS		
		pH	Acid content	Sugar consumption
Treatment	19	0.055*	0.001*	36.100*
Error	20	0.009	0.000	0.827

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.10 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหารและปริมาณน้ำตาลที่ใช้ โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการต่อเชื้อเมื่อเลี้ยงในภาวะเขย่า

SOV	df	MS		
		pH	Acid content	Sugar consumption
Treatment	19	0.064*	0.001*	41.988*

Error	20	0.001	0.000	1.314
-------	----	-------	-------	-------

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ 11 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาน้ำขึ้น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้และการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 893 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำกรเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า

SOV	df	MS						
		Thickness	Wet weight	pH	Acid content	Cellulose content	Sugar consumption	Cellulose production
Treatment	5	0.003*	2.027*	0.087*	0.002*	0.177*	46.497*	75.190*
Error	24	0.001	0.305	0.012	0.000	0.022	1.336	2.270

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.12 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาแน่น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณ เซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้และการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 975 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำกรเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า

SOV	df	MS						
		Thickness	Wet weight	pH	Acid content	Cellulose content	Sugar consumption	Cellulose production
Treatment	5	0.003	8.708	0.042*	0.002*	0.564*	56.340*	168.402*
Error	24	0.001	3.522	0.013	0.000	0.010	4.804	10.301

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.13 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาแน่น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณ เซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้และการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำกรเลี้ยงในอาหารเหลวที่ภาวะเขย่า

SOV	df	MS						
		Thickness	Wet weight	pH	Acid content	Cellulose content	Sugar consumption	Cellulose production
Treatment	5	0.030*	12.432*	0.150*	0.001*	1.201*	48.709*	123.614*
Error	24	0.001	0.686	0.010	0.000	0.045	2.840	6.598

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



ตารางที่ ง.14 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาแน่น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณ เซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้และการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 893 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำกรเลี้ยงในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง

SOV	df	MS						
		Thickness	Wet weight	pH	Acid content	Cellulose content	Sugar consumption	Cellulose production
Treatment	3	0.034*	14.153*	0.016*	0.000*	0.788*	5.499*	344.601*
Error	16	0.001	0.703	0.003	0.000	0.008	0.731	9.366

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.15 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาแน่น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณ เซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้และการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 975 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำกรเลี้ยงในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง

SOV	df	MS						
		Thickness	Wet weight	pH	Acid content	Cellulose content	Sugar consumption	Cellulose production
Treatment	3	0.133*	23.038*	0.108*	0.002*	0.208*	32.099*	136.992*
Error	16	0.005	2.034	0.010	0.000	0.006	3.828	4.832

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.16 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาแน่น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณ เซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้และการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 1037 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน วัดเมื่อต่อเชื้อครบทุก 4 ครั้งที่ทำกรเลี้ยงในอาหารเหลวสลับกับอาหารแข็ง

SOV	df	MS						
		Thickness	Wet weight	pH	Acid content	Cellulose content	Sugar consumption	Cellulose production
Treatment	3	0.090*	59.179*	0.015*	0.001*	0.309*	24.230*	341.534*
Error	16	0.001	0.698	0.003	0.000	0.006	0.849	3.628

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.17 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาแน่น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณ เซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้และการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 893 และ 893A เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

SOV	df	MS						
		Thickness	Wet weight	pH	Acid content	Cellulose content	Sugar consumption	Cellulose production
Treatment	1	0.001	1.424	0.088*	0.002*	0.519*	289.982*	1242.779*
Error	8	0.001	0.321	0.002	0.000	0.018	2.451	4.538

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.18 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาแน่น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณ เซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้และการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 975 975A และ 975B เมื่อเลี้ยงในอาหาร เหลวน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

SOV	df	MS						
		Thickness	Wet weight	pH	Acid content	Cellulose content	Sugar consumption	Cellulose production
Treatment	1	0.507*	329.253*	0.088*	0.004*	0.126*	55.277*	413.556*
Error	8	0.001	5.267	0.020	0.001	0.005	3.146	5.347

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ง.19 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความหนาแน่น น้ำหนักเปียก ค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร ปริมาณกรดในอาหาร ปริมาณ เซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลที่ใช้และการผลิตเซลลูโลส โดย *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ TISTR 1037 และ 1037A เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

SOV	df	MS						
		Thickness	Wet weight	pH	Acid content	Cellulose content	Sugar consumption	Cellulose production
Treatment	1	0.018*	51.683*	0.076*	0.000	0.605*	171.562*	461.856*
Error	8	0.002	5.675	0.007	0.000	0.027	1.920	6.042

\* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนริศรา กิตติวณิชานนท์ เกิดเมื่อวันที่ 24 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับสอง) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2540 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541

### ผลงานทางวิชาการ

- Kittivanichanon, N., Tantratian, S., and Rimpanichayakij, V. 2002. The variation of *Acetobacter* sp. TISTR 893, TISTR 975 and TISTR 1037. Poster presentation. The Proceeding of 40<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference. 4-7 Feb. Bangkok: Kasetsart University.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย