แบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู (Acetic Acid Bacteria)

วันเชิญ โพธาเจริญ*, ภัทรพร (ยุคแผน) รัตนวารี, ทวีศักดิ์ มะลิมาศ และ ยูโซะ ยามาดะ
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120
wanchern@biotec.or.th

บทนำ

แบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการผลิตกรดน้ำส้มสายชู มีประโยชน์และความสำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น การผลิตน้ำส้มสายชู ที่เราคุ้นเคยกับการนำมาใช้เป็นเครื่องปรุง เพิ่มรสชาติในการประกอบอาหาร เช่น พริกดองในการปรุงรสก๋วยเตี๋ยว ใช้ในการถนอมอาหาร เช่น ดองผัก ผลไม้ เป็นต้น แบคทีเรียชนิดนี้ยังเป็นส่วนสำคัญในการทำเครื่องดื่มบำรุงกำลังและรักษาสุขภาพ เช่น น้ำหมักเห็ดรัสเซีย (Tea fungus or Kombucha) ซึ่งเป็นเครื่องดื่มสุขภาพที่แพร่หลายในจีน ญี่ปุ่น และอินเดียมากว่า 1,000 ปี ก่อนคริสตกาล (Kersters, et al., 2003) ภายหลังมีการศึกษาองค์ประกอบของน้ำหมักชนิดนี้ พบว่ามีกรดและไวตามินหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและร่างกาย เช่น กรดอะซิติค กรดแลคติค กรดมาลิค กรดออกซาลิค กรดกลูโคนิค กรดอะมิโน และไวตามิน B และ C (พรรณี และคณะ, 2545; http:/kombuchatea.co.uk) น้ำหมักชนิดนี้จึงได้รับความนิยมทั่วไปทั้งในยุโรป อเมริกาและเอเชีย นอกจากด้านประโยชน์แล้วแบคทีเรียชนิดนี้ยังเป็นตัวการที่ทำให้ไวน์มีรสเปรี้ยว (sour wine) ทำให้ผลไม้เน่าเสีย จากคุณสมบัติที่มีความสำคัญทั้งสองด้าน นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจศึกษาแบคทีเรียชนิดนี้ เพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ และการควบคุมกำจัด

ประวัติการศึกษาแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูและการจัดจำแนก

ตั้งแต่ในยุคแรกๆ (ประมาณ 4,000 ปีก่อนคริสตกาล) มีรายงานการพบข้อเขียนของชาวเมืองบาบิโลเนียน ซึ่งเป็นอาณาจักรโบราณในเอเชียตะวันตกเฉียงใต้ ในเรื่องไวน์เปรี้ยว (Kersters et al., 2003) ซึ่งในสมัยนั้นยังไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ยืนยันว่ามีสาเหตุเกิดจากอะไร จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2432 (ค.ศ. 1898) นักวิทยาศาสตร์ชาวเนเธอร์แลนด์ ชื่อ Beijerinck เป็นคนแรกที่ได้ศึกษาและตั้งชื่อแบคทีเรียที่ทำให้ไวน์มีรสเปรี้ยวว่า *Acetobacter* อันมาจากคุณสมบัติในการผลิตกรดอะซิติค หรือกรดน้ำส้มสายชู จากแอลกอฮอล์นั่นเอง แบคทีเรียชนิดนี้มีลักษณะเป็นท่อนขนาดเล็กมาก เฉลี่ยความกว้าง x ความยาว ประมาณ 0.6 x 2.5 ไมครอน (1 ไมครอน = $1/10^6$ เมตร) อยู่แบบเดี่ยว หรือเป็นเส้นสาย ขึ้นกับสภาพแวดล้อมและอาหาร เมื่อนำมาย้อมสีจะติดสีแดง พบทั่วไปในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และในปี พ.ศ. 2478 (ค.ศ. 1935) นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น ชื่อ Asai ศึกษาแบคทีเรียที่อยู่ในผลไม้หลายชนิด และพบแบคทีเรียกลุ่มนี้สร้างกรดอะซิติคเหมือนกันแต่ให้ปริมาณน้อยกว่าการสร้างกรดกลูโคนิค จึงให้ชื่อแบคทีเรียที่พบว่า *Gluconobacter* เพราะมีคุณสมบัติในการผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคส เมื่อศึกษารูปร่างและคุณสมบัติทั่วไปจึงให้แบคทีเรีย 2 กลุ่มนี้อยู่ในตระกูลเดียวกันคือ Acetobacteraceae

ความสนใจศึกษาแบคทีเรียในตระกูลนี้เริ่มขึ้นอย่างจริงจังในช่วงต้นปี ค.ศ. 1980 โดยมุ่งเน้นด้านการจัดจำแนกเป็นส่วนใหญ่ มีการรวบรวมข้อมูลด้านรูปร่างลักษณะ คุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อประกอบกันเป็นโครงสร้างในการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มนี้ (Gillis and De Ley, 1980; Yamada and Kondo, 1984) ส่วนประกอบทางเคมีของ แบคทีเรียชนิดนี้มี โคเอนไซม์คิว (Coenzyme Q) หลายชนิด และที่สำคัญคือ Q-9 และ Q-10 จึงได้นำมาใช้ในการจัดจำแนกร่วมกับลักษณะทางชีวเคมี (Yamada and Kondo, 1984; Sievers and Swings, 2005; Kersters et al., 2006) นอกจากนี้พัฒนาการด้านการจำแนกแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล โดยเฉพาะ 16S rRNA/rDNA sequences (Yamada et al., 1997) ทำให้เพิ่มขีดความสามารถด้านการจำแนกให้รวดเร็วและแม่นยำมากขึ้น ปัจจุบันแบคทีเรียชนิดนี้ จำแนกได้ 10 สกุล และ 42 ชนิด (ตารางที่ 1) จากงานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก คือ

สกุล *Acetobacter, Gluconobacter, Acidomonas*, *Gluconacetobacter, Asaia, Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia* และ *Granulibacter* ซึ่งที่พบในไทยมี 1 สกุล คือ *Neoasaia* และ 4 ชนิด คือ *Asaia siamensis* (Katsura et al., 2001) *Asaia krungthepensis* (Yukphan et al., 2004), *Gluconobacter thailandicus* (Tanasupawat et al., 2004). *Neoasaia chiangmaiensis* (Yukphan et al., 2005)

ตารางที่ 1. สกุลและชนิดของแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูที่พบในปัจจุบัน

ชื่อสกุลและชนิด	รหัสเชื้อต้นแบบ
Acetobacter aceti Beijerinck, 1898	BCC 12455 = ATCC 15973 = DSM 3508 = NBRC 14818 = JCM 7641
Acetobacter cerevisiae Cleenwerck et al. 2002	ATCC 23765 = DSM 14362
Acetobacter cibinongensis Lisdiyanti et al. 2001	BCC 23126 = NBRC 16605 = JCM 11196
Acetobacter estunensis Lisdiyanti et al. 2000	BCC 23120 = ATCC 23753 = DSM 4493 = NBRC 13751
Acetobacter indonesiensis Lisdiyanti et al. 2000	BCC 23124 = NBRC 16471 = JCM 10948
Acetobacter lovaniensis Lisdiyanti et al. 2000	BCC 23122 = ATCC 12875 = DSM 4491 = NBRC 13753
Acetobacter malorum Cleenwerck et al. 2002	DSM 14337 = LMG 1746
Acetobacter oeni Silva et al. 2006	CECT 5830 = LMG 21952
Acetobacter orientalis Lisdiyanti et al. 2001	BCC 23127 = NBRC 16606 = JCM 11195
Acetobacter orleanensis Lisdiyanti et al. 2000	BCC 23121 = ATCC 12876 = DSM 4492 = NBRC 13752 = JCM 7639 = LMG 1583
Acetobacter nitrogenifigens Dutta and Gachhui 2006	LMG 23498 = MTCC 6912
Acetobacter pasteurianus Beijerinck, 1916	BCC 12262 = ATCC 33445 = DSM 3509 = NBRC 22001 = JCM 7640 = NRIC 0241
Acetobacter peroxydans Visser't Hooft, 1923	ATCC 12874 = NBRC 13755 = LMG 1635
Acetobacter pomorum Sokollek et al. 1998	DSM 11825 = LMG 18848
Acetobacter syzygii Lisdiyanti et al. 2001	BCC 23125 = NBRC 16604 = JCM 11197
Acetobacter tropicalis Lisdiyanti et al. 2000	BCC 23123 = NBRC 16470 = JCM 10947
Acidomonas methanolica Urakami et al. 1989	BCC 12263 = ATCC 43581 = DSM 5432 = NBRC 89007 = JCM 6891
Asaia bogorensis Yamada et al. 2000	BCC 12264 = NBRC 16594 = JCM 10569 = NRIC 0311
Asaia krungthepensis Yukphan et al. 2004	BCC 12978 = NBRC 100057 = TISTR 1524
Asaia siamensis Katsura et al. 2001	BCC 12268 = NBRC 16457 = JCM 10715
Gluconacetobacter azotocaptans Fuentes-Ramirez et al. 2001	ATCC 700988 = DSM 13594
Gluconacetobacter diazotrophicus Yamada et al. 1998,	ATCC 49037 = DSM 5601 = LMG 7603
Gluconacetobacter entanii Schüller et al. 2000	DSM 13536
Gluconacetobacter europaeus Yamada et al. 1998	ATCC 51845 = DSM 6160 = LMG 18890
Gluconacetobacter hansenii Yamada et al. 1998	BCC 12272 = ATCC 35959 = DSM 5602 = NBRC 14820 = JCM 7643
Gluconacetobacter intermedius Boesch et al. 1998	DSM 11804 = LMG 18909
Gluconacetobacter johannae Fuentes-Ramirez et al. 2001	ATCC 700987= DSM 13595
Gluconacetobacter liquefaciens Yamada et al. 1998	BCC 12274 = ATCC 14835 = DSM 5603 = NBRC 12388 = LMG 1381 = LMG 1382

ตารางที่ 1. (ต่อ)

ชื่อสกุลและชนิด	รหัสเชื้อต้นแบบ
Gluconacetobacter nataicola Lisdiyanti et al. 2006	LMG 1536 = NRIC 0616
Gluconacetobacter oboediens Sokollek et al. 1998	DSM 11826 = LMG 18849
Gluconacetobacter rhaeticus Dellaglio et al. 2005	DSM 16663 = LMG 22126
Gluconacetobacter sacchari Franke et al. 1999	CIP 106693 = DSM 12717
Gluconacetobacter saccharivorans Lisdiyanti et al. 2006	LMG 1582 = NRIC 0614
Gluconacetobacter swingisii Dellaglio et al. 2005	DSM 16373 = LMG 22125
Gluconacetobacter xylinus Yamada et al. 1998	BCC 12456 = ATCC 23767= DSM 6513 = NBRC 15237
Gluconobacter albidus Kondo and Ameyama 1958	BCC 14434 = NBRC 3250
Gluconobacter cerinus Yamada and Akita 1984	BCC 12339 = ATCC 19441 = DSM 9533 = NBRC 3267
Gluconobacter frateurii Mason and Claus 1989	BCC 12341 = ATCC 49207 = DSM 7146
Gluconobacter oxydans De Ley, 1961	BCC 12337 = ATCC 19357 = DSM 3503 = NBRC 9013
Gluconobacter thailandicus Tanasupawat et al. 2005	BCC 14116 = NBRC 100600 = JCM 12310 = TISTR 1533
Granulibacter bethesdensis Greenberg *et al*. 2006	ATCC BAA-1260 = DSM 17861
Kozakia baliensis Lisdiyanti et al. 2002	BCC 12275 = DSM 14400 = NBRC 16664 = JCM 11301
Neoasaia chiangmaiensis Yukphan et al. 2006	BCC 15763 = NBRC 101099
Saccharibacter floricola Jojima et al. 2004	DSM 15669 = JCM 12116
Swaminathania salitolerans Loganathan and Nair 2004	BCC 17684 = LMG 21291 = MTCC 3852

หมายเหตุ: ATCC: American Type Culture Collection. Corporate, USA; **BCC**: BIOTEC Culture Colllection, Thailand; **NBRC**: Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (NITE), Japan; **DSM**: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany; **LMG**: Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica, Belgium; **MTCC**: Microbial Type Culture Collection & Gene Bank, India; **JCM**: Japan Collection of Microorganisms, Japan; **TISTR**: Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Thailand; **NRIC**: NODAI Research Institute Culture Collection, Japan; **CIP**: Collection de l'Institut Pasteur, France

การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู (Acetic Acid Bacteria)

แบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูเป็นแบคทีเรียซึ่งเป็นที่รู้จักโดยทั่วไปว่านำมาใช้ในการผลิตกรดน้ำส้มสายชูเป็นหลัก แต่นอกจากการผลิตน้ำส้มสายชูแล้ว แบคทีเรียกลุ่มนี้ยังมีความสำคัญในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพอีกหลายด้าน เช่น การผลิตเซลลูโลส การผลิต sugar alcohol การผลิตสารตัวกลางที่สำคัญที่ใช้ในการผลิตสารที่มีคุณค่าหลายชนิด รวมทั้งการใช้เป็น biological sensor ทั้งในรูปของเซลล์และ Immobilized enzyme เป็นต้น

1. การผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

แบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูบางสายพันธุ์สามารถผลิตเซลลูโลสได้ ซึ่งสายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปคือ *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*) ซึ่งเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียนั้นมีคุณสมบัติที่ดีกว่าเซลลูโลสโดยทั่วไป คือ โปร่งแสง เหนียว แข็งแรง สามารถใช้ได้กับสิ่งมีชีวิต ย่อยสลายได้ โดยมีการนำเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียนี้มาประยุกต์ใช้หลายด้าน เช่น เป็นอาหาร (วุ้นมะพร้าว), เป็นส่วนประกอบในหูฟัง (sensitive diaphragms for stereo headphones), ใช้ปิดแผลที่ถูกไฟไหม้ (short-

term protection of burned skin), ใช้เป็นแผ่นกรองจำเพาะ (selective permeation membranes) (Czaja et al., 2006), electronic paper, artificial blood vessels

2. การผลิต Sugar alcohol

แบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูสามารถผลิต sugar alcohol ได้หลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Gluconobacter* ซึ่ง sugar alcohol ที่สำคัญที่แบคทีเรียในกลุ่มนี้ผลิตได้ ได้แก่ L-sorbose เป็นสารตัวกลางในการผลิต vitamin C, 6-amino-L-sorbose เป็นสารตัวกลางในการผลิต antidiabetic drug miglitol (Deppenmeier et al., 2003) tagatose จาก D-galactitol โดย *Gluconobacter oxydans* tagatose เป็นสารให้ความหวานที่มีแคลอรี่ต่ำ แต่มีประโยชน์กับร่างกาย พบในปริมาณน้อยในธรรมชาติ (Rollini and Manzoni, 2005) Xylitol จาก D-arabitol เป็นสารให้ความหวานแทน sucrose ซึ่งใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหารและยา โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับช่องปาก สามารถผลิตได้จาก *Gluconobacter oxydans* (Sugiyama et al., 2003 และ Suzuki et al., 2002) D-Mannitol และ D-sorbitol dehydrogenase จาก *Gluconobacter oxydans* ซึ่งใช้ในการผลิต D-mannitol และ D-sorbitol จาก D-fructose

3. การผลิตสารตัวกลางที่สำคัญที่ใช้ในการผลิตสารอื่น ๆ

Dihydroxyacetone เป็นสารที่ใช้เป็น tanning agent ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และใช้เป็นตัวกลางที่สำคัญในการผลิตสารอินทรีย์หลายชนิด และใช้เป็น surfactant (Deppenmeier et al., 2003) Gluconate (Deppenmeier et al., 2003) Ketogluconate (Deppenmeier et al., 2003; Matsushita et al., 2003) 3-dehydroquinate (DQA) และ 3-dehydroshikimate (DSA) โดยแบคทีเรียในสกุล *Gluconobacter* ซึ่งสารสองชนิดนี้เป็นสารตัวกลางที่สำคัญใน Shikimate pathway ซึ่งเป็น pathway ที่สำคัญในอุตสาหกรรมยา เนื่องจากเป็น pathway ที่เกี่ยวข้องในการผลิต aromatic amino acid, antibiotics, biodegrading herbicides และ pesticides (Adachi et al., 2003) 2,3-butanediol เป็นสารตัวกลางในการผลิต acetoin และ diacetyl ซึ่ง acetoin เป็นตัวกลางในการพากลิ่นและรส และ diacetyl ซึ่งเป็น organoleptic quality ของผลิตภัณฑ์จากนม และเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นเนย

4. การผลิตสารอื่น ๆ

Glycolic acid ซึ่งเป็นสารที่ใช้มากในอุตสาหกรรมซักฟอกผ้าและเครื่องหนัง รวมทั้งใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูสกุล *Acetobacter* และ *Gluconobacter* (Kataoka et al., 2001) Butyric acid เป็นสารเคมีที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง รวมทั้งอุตสาหกรรมยา สามารถผลิตได้จาก butanol oxidation โดย *Gluconobacter oxydans* (Zigová et al., 2000) Dextran dextrinase จาก *Gluconobacter oxydans* ซึ่งเปลี่ยน maltodextrins เป็น (oligo) dextran, D-hexosaminate จาก *Gluconobacter frateurii* (model) (Moonmangmee et al., 2004)

5. การใช้เป็น biological sensor

Glucose detection (Lee et al, 2002) Glucose and ethanol detection, Flexible osmium-redox polyelectrolyte (Vostiar et al., 2004) Quinohemoprotein alcohol dehydrogenase immobilized on carbon rod electrode (Ramanavicius et al., 2006)

6. การตรึงไนโตรเจน

แบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูบางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เช่น *Gluconacetobacter diazotrophicus* ซึ่งได้ศึกษาการนำมาใช้ประโยชน์ในการปลูกอ้อยในประเทศบราซิล

7. การย่อยสลายเบนซีน

เนื่องจากแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูมีความสามารถในการใช้แอลกอฮอล์และน้ำตาลได้หลายชนิด ได้มีการศึกษาการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในการบำบัดการปนเปื้อนของเบนซีนในอากาศด้วยกระบวนการ biofitration โดยอาศัยแบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus* (Bilská et al., 2006)

การศึกษาแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูในประเทศไทยโดยเฉพาะในอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ

การศึกษาแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูในประเทศไทย แบ่งเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ (1) ศึกษาด้านการใช้ประโยชน์ และ (2) ศึกษาด้านการจำแนก ซึ่งบทความนี้จะมุ่งเน้นเรื่องการจำแนกเท่านั้น โครงการ

BRT ได้ให้การสนับสนุนการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มนี้ทั่วประเทศ โดยให้เน้นพื้นที่ทองผาภูมิเป็นหลัก อย่างไรก็ตาม การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียชนิดนี้ในประเทศไทยยังไม่มีรายงาน ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของโครงการจึงเป็นการศึกษาความหลากหลาย การพัฒนานักจัดจำแนก รวมถึงการจัดตั้ง Acetic Acid Bacteria Collection ในประเทศไทย เพื่อเตรียมความพร้อมในการส่งเสริมด้านการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ทั้งในด้านการวิจัย การศึกษา และการพัฒนาเชิงพาณิชย์ พื้นที่ศึกษาคือภาคต่างๆ ของไทย เช่น ภาคเหนือ (เชียงใหม่) ภาคอีสาน (นครราชสีมา) ภาคกลาง (กรุงเทพ นนทบุรี) และภาคตะวันตก (กาญจนบุรี)

วิธีการ

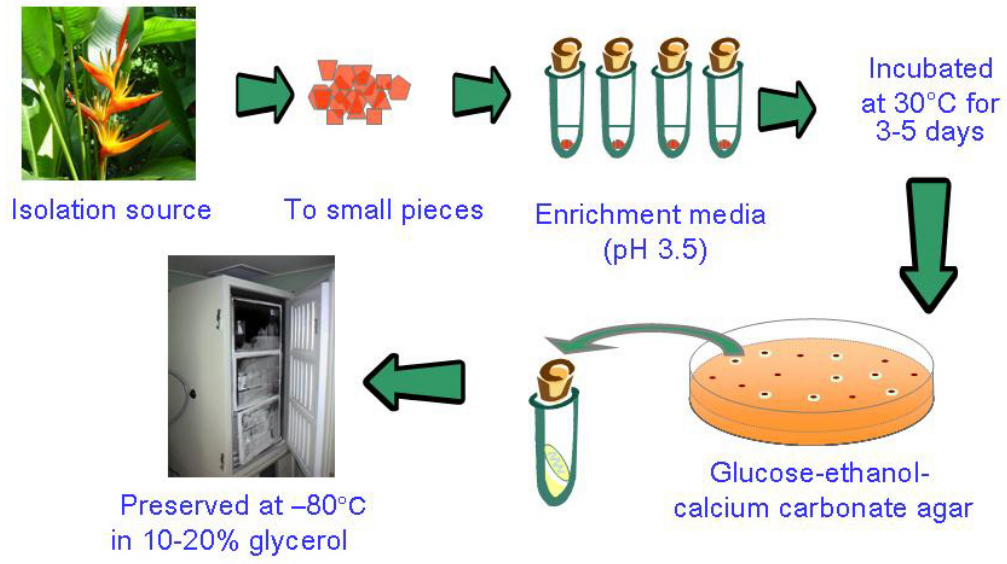
การเก็บตัวอย่างและคัดแยกแบคทีเรีย ตัวอย่างที่เก็บมาคัดแยก ได้แก่ ดอกไม้ ผลไม้ อาหารหมักดอง น้ำตาลเมา ลูกแป้ง ดิน เห็ด แหล่งน้ำเสีย เป็นต้น (ภาพที่ 1)

การคัดแยกแบคทีเรีย ลักษณะจำเพาะของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือสามารถเจริญบนอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่ำ ชอบอาหารที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบ และชอบอุณหภูมิปานกลางที่ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้นอาหารที่ใช้และสภาพแวดล้อมจึงต้องปรับให้เหมาะสมเพื่อกระตุ้นการเจริญและสามารถแข่งขันกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมายของการคัดแยก นอกจากนี้ในอาหารยังมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปด้วยเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ถึงแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรด ทำให้เกิดวงใสๆ รอบโคโลนี ช่วยให้เลือกกลุ่มเป้าหมายได้ถูกต้อง จากตัวอย่างที่เก็บนำมาศึกษาสามารถแยกแบคทีเรียได้กว่า 300 ไอโซเลท จากทั่วประเทศ ซึ่งในจำนวนนี้มี 139 ไอโซเลท จากพื้นที่ทองผาภูมิ (ภาพที่ 2 และ 3)

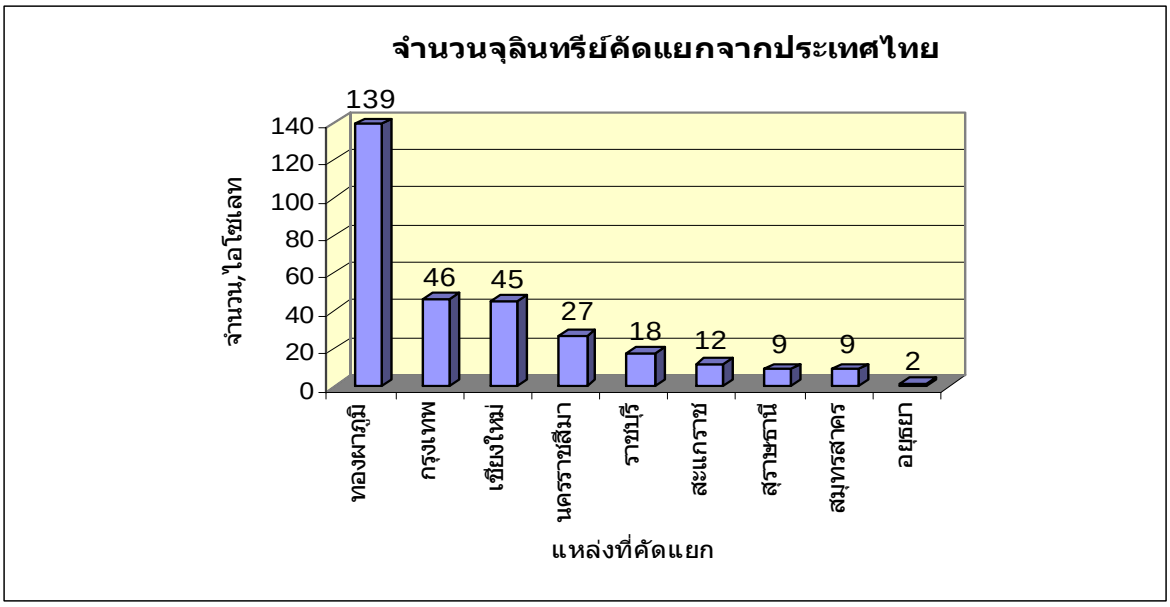
การจำแนกแบคทีเรีย

การจำแนกแบคทีเรียโดยหลักการมี 3

ภาพที่ 1. ตัวอย่างที่นำมาคัดแยกแบคทีเรียจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย



ภาพที่ 2. วิธีการคัดแยกจุลินทรีย์จากวัสดุตัวอย่างที่เก็บมาจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย



ภาพที่ 3. จำนวนจุลินทรีย์ที่แยกจากวัสดุตัวอย่างที่เก็บมาจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย

ขั้นตอนคือ

1. ศึกษารูปร่าง ลักษณะ การติดสี และการเคลื่อนไหว
2. ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีตามที่ระบุใน Asai et al., 1964 และ Yamada et al., 1976
3. ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีอันประกอบด้วย ชนิดของโคเอนไซม์ Q, fatty acid, G+C การวิเคราะห์ DNA Content

ผลการวิจัย

การจำแนกแบคทีเรียจากวัสดุต่างๆ พบ 5 สกุล คือ *Acetobacter, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter* และ *Neoasaia* แบคทีเรียกลุ่มนี้จะพบมากที่สุดในดอกไม้ และรองลงมาคือผลไม้ โดยจะพบสกุล *Asaia* และ *Gluconobacter* มากที่สุด แสดงว่าดอกไม้คือถิ่นอาศัยของแบคทีเรียสกุลนี้ (ตารางที่ 2)

เมื่อศึกษาการกระจายพันธุ์ของแบคทีเรียเปรียบเทียบระหว่างจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้แต่ละสกุลกระจายอยู่ตามที่ต่างๆ กัน จังหวัดอยุธยา นนทบุรี ราชบุรี สมุทรสาคร และสุราษฎร์ธานี จะพบเพียงสกุลเดียวคือ *Gluconacetobacter* และ *Asaia* ตามลำดับ ในขณะที่เชียงใหม่จะพบทุกสกุล นครราชสีมาจะพบเพียง 2 สกุล ส่วนที่ทองผาภูมิ พบ 3 สกุล (ตารางที่ 3 และภาพที่ 4) การสรุปครั้งนี้เป็นเพียงการสรุปเบื้องต้นจากข้อมูลที่มีอยู่เท่านั้นซึ่งอาจจะคลาดเคลื่อนอันเนื่องมาจากจำนวนและชนิดของตัวอย่างที่เก็บมาคัดแยกมีไม่เท่ากัน

บทสรุป

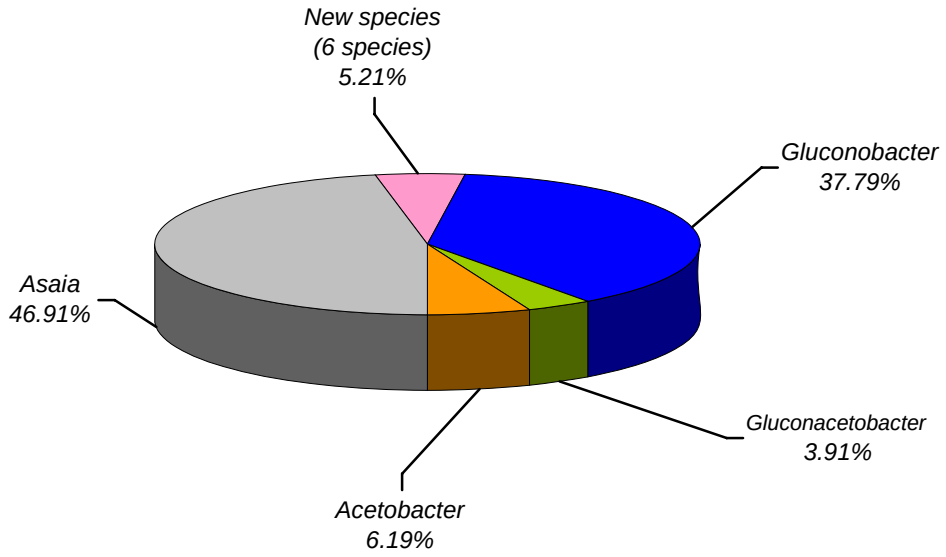
การศึกษาแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูเป็นโครงการที่ได้รับการสนับสนุนจากโครงการ BRT มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาความหลากหลายของ

ตารางที่ 2. ชนิดจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากวัสดุต่างๆ

Genera	Sources					Total
	Fermented food	Flower	Fruit	Soil	Other	
Acetobacter sp.	0	9	8	0	2	19
Asaia sp.	0	132	19	0	2	153
Gluconacetobacter sp.	0	7	2	3	0	12
Gluconobacter sp.	2	42	70	3	5	122
Neoasaia sp.	0	1	0	0	0	1
Total	2	191	99	6	9	307

ตารางที่ 3. ชนิดแบคทีเรียที่คัดแยกและจำแนกจากตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย

จังหวัด	Genus					
	Acetobacter sp.	*Asaia* sp.	*Gluconacetobacter* sp.	*Gluconobacter* sp.	*Neoasaia* sp.	Grand Total
Ayuthaya	0	0	0	2	0	2
Bangkok	0	19	4	12	0	35
Chiang-Mai	5	16	5	18	1	45
Kanchanaburi	**14**	**72**	**0**	**54**	**0**	**140**
Nakornratchasima	0	0	3	36	0	39
Nonthaburi	0	10	0	0	0	10
Ratchaburi	0	18	0	0	0	18
Samusakorn	0	9	0	0	0	9
Surathani	0	9	0	0	0	9
Grand Total	**19**	**153**	**12**	**122**	**1**	**307**



ภาพที่ 4. ความแตกต่างเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนสกุลของแบคทีเรียที่พบ

แบคทีเรียกลุ่มนี้ในประเทศไทยซึ่งยังไม่มีรายงานมาก่อน ตัวอย่างที่นำมาคัดแยกประกอบด้วยดอกไม้ ผลไม้ อาหารหมักดอง น้ำตาลเมา ลูกแป้ง ดิน และเห็ด แบคทีเรียจำนวนกว่า 300 ไอโซเลท ถูกคัดแยกมาจากพื้นที่ต่างๆ และนำมาศึกษา โดยที่การเก็บตัวอย่างจะมุ่งเน้นในพื้นที่ทองผาภูมิ จึงมีผลสรุปของจำนวนแบคทีเรียในพื้นที่นี้คือ 140 ไอโซเลท ประกอบด้วย 3 สกุล 4 ชนิด (ตารางที่ 4) จากโครงการนี้ทำให้มีผลงานอื่นๆ ตามมา ที่สำคัญคือ 1) พบแบคทีเรียเป็นชนิดใหม่ของโลก 1 สกุล คือ *Neoasaia* และอีก 2 ชนิด (เฉพาะ

ตารางที่ 4. จำนวนสกุลและชนิดของแบคทีเรียที่พบในทองผาภูมิ

ชื่อสกุล และชนิด	จำนวน
Acetobacter lovaniensis	1
Acetobacter sp.	13
Asaia krungthepensis	1
Asaia sp.	71
Gluconobacter frateurii	2
Gluconobacter oxydans	1
Gluconobacter sp.	51
รวม	**140**

ในโครงการนี้) ที่ได้นำเผยแพร่ในระดับสากล คือ *Asaia krungthepensis*, *Neoasaia chiangmaiensis* 2) ได้พัฒนาเทคนิคแบบใหม่ที่ใช้ในการจำแนกอย่างรวดเร็ว 1 วิธี 3) ได้นักจำแนกแบคทีเรีย 1 คน ที่มีความสามารถถึงขั้นให้บริการจำแนกแก่ผู้สนใจทั่วไปได้ 4) มีผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ 5 ฉบับ และ 5) มี Bacterial Culture Collection ที่ BIOTEC ที่พร้อมให้บริการสายพันธุ์แบคทีเรียชนิดนี้

ผู้ที่มีส่วนกระตุ้นให้การศึกษาแบคทีเรียชนิดนี้เป็นที่สนใจมากขึ้น โดยเฉพาะในประเทศไทย คือ Professor Yuzo Yamada จากมหาวิทยาลัยชิซุโอกะ ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งได้รับทุนจากรัฐบาลญี่ปุ่นมาประจำในประเทศไทย (ไบโอ-เทค) เป็นเวลา 2 ปี (2545-2547)

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) รหัสโครงการ BRT R_146001 ได้รับความร่วมมือในการเข้าเก็บตัวอย่างในพื้นที่จากเจ้าหน้าที่ของ ปตท. โดยเฉพาะคุณเนาวรัตน์ ศัพทะนาวิน และได้รับการสนับสนุนจาก BIOTEC ในการเชิญผู้เชี่ยวชาญมาร่วมโครงการ ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ที่กล่าวถึงไว้ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

พรรณี รัตนชัยสิทธิ์, พิมพ์อร บัวจรัส, รัตยาภรณ์ จิตรแหง. 2545. การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบบางชนิดใน kombucha. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28, 24-26 ตุลาคม 2545 ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ. หน้า 22.

Adachi, O., S. Tanasupawat, N. Yoshihara, H. Toyama and K. Matsushita 2003. 3-Dehydroquinate production by oxidative fermentation and further conversion of 3-Dehydroquinate to the intermediates in the Shikimate Pathway, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 2124-2131.

Czaja, W., A. Krystynowicz, S. Bielecki and Jr., R. Malcolm Brown. 2006. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. *Biomaterials* 27(2): 145-151.

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

Kataoka, M., Mié Sasaki, Aklani-Rose, G.D. Hidalgo, M. Nakano and S. Shimizu. 2001. Glycolic acid production using ethylene glycol-oxidizing microorganisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2265-2270.

Katsura, K., H. Kawasaki, W. Potacharoen, S. Saono, T. Seki, Y. Yamada, T. Uchimura and K. Komagata. 2001. *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α-Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology* 51: 559-563.

Kersters, K., P. Lisdiyanti, K. Komagata and J. Swings. 2006. The family *Acetobacteraceae*: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* and *Kozakia*. *In* M. Dworkin, M. Falcow, S. Rosenberg, E. Schleifer, K.-H., Stackebrands, E. (eds.), The Prokaryotes: 3rd ed., Vol. 5, Springer, New York.

Lee, S.A., Y. Choi, S. Jung and S. Kim. 2002. Effect of initial carbon sources on the electrochemical detection of glucose by *Gluconobacter oxydans*. *Bioelectrochemistry* 57(2): 173-178.

Matsushita, K., Y. Fujii, Y. Ano, H. Toyama, M. Shinjoh, N. Tomiyama, T. Miyazaki, T. Sugisawa, T. Hoshino and O. Adachi. 2003. 5-Keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in gluconobacter species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1959-1966.

Moonmangmee, D., O. Adachi, H. Toyama and K. Matsushita. 2004. D-hexosaminate production by oxidative fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66(3): 253-8.

Ramanavicius, A., A. Kausaite and A. Ramanaviciene. 2005. Biofuel cell based on direct bioelectrocatalysis. *Biosensors and Bioelectronics* 20(10): 1962-1967.

Rollini M. and M. Manzoni. 2005. Bioconversion of D-galactitol to tagatose and dehydrogenase activity induction in *Gluconobacter oxydans*. Process Biochemistry 40(1): 437-444.

Sievers, M. and J. Swings. 2005. Genus V. *Acidomonas* Urakami, Tamaoka, Suzuki and Komagata 1989a, 54^{VP}. *In* D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley and G.M. Garrity (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, pp. 68-69. Springer, New York.

Sugiyama, M., S. Suzuki, N. Tonouchi and K. Yokozeki. 2003. Cloning of the xylitol dehydrogenase gene from *Gluconobacter oxydans* and improved production of xylitol from D-Arabitol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 584-591.

Suzuki, S., M. Sugiyama, Y. Mihara, K. Hashiguchi and K. Yokozeki. 2002. Novel enzymatic method for the production of xylitol from D-Arabitol by *Gluconobacter oxydans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 2614-2620.

Tanasupawat, S., C. Thawai, P. Yukphan, D. Moonmangmee, T. Itoh, O. Adachi and Y. Yamada. 2004. *Gluconobacter thailandicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α-*Proteobacteria*. *Journal of General and Applied Microbiology* 50: 159-167.

Vostiar et al. 2004. Electrical "wiring" of viable *Gluconobacter oxydans* cells with a flexible osmium-redox polyelectrolyte. *Electrochemistry Communications* 6(7): 621-626.

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

Yamada, Y., K.-I. Hoshino and T. Ishikawa. 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 1244-1251.

Yukphan, P., T. Malimas, W. Potacharoen, S. Tanasupawat, M. Tanticharoen and Y. Yamada. 2005. *Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the a -*Proteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1(51): 301-311.

Yukphan, P., W. Potacharoen, S. Tanasupawat, M. Tanticharoen and Y. Yamada. 2004. *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α-*Proteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology* 54: 313-316.