

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยทุนพัฒนานักวิจัย รุ่นที่ 2 ประจำปี 2538

เรื่อง

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงสายพันธุ์ของ
เชื้อกรดน้ำส้มที่ทนอุณหภูมิสูง ด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม
(Analysis of genetic variations and strain improvement of
thermotolerant acetic acid bacteria by genetic engineering)

โดย

ผศ. ดร. กัญจนา ธีระกุล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภายใต้การสนับสนุนของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และ
บัณฑิตวิทยาลัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(1 กันยายน 2538- 31 สิงหาคม 2541)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยและทุนสนับสนุนสมทบ ที่ปรึกษาโครงการ (ศาสตราจารย์ นภา โล่ห์ทอง) และคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่กรุณาเสนอแนะแนวทางการทำวิจัยเพื่อให้ได้ผลงานบรรลุวัตถุประสงค์ และขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่อนุเคราะห์สถานที่ทำวิจัยรวมทั้งสารเคมีพื้นฐานบางส่วนที่จำเป็นต่องานวิจัย

งานบางส่วนของโครงการนี้ได้รับทุนแลกเปลี่ยนนักวิจัยจากรัฐบาลญี่ปุ่น ภายใต้โปรแกรม Monbusho International Scientific Research Program: Kasetsart University-Yamaguchi University โดยได้รับความอนุเคราะห์และคำปรึกษาจาก Professor Dr. Osao Adachi, Professor Dr. Kazunobu Matsushita, Dr. Hirohide Toyama และ Mr. Akihiko Saeki จากมหาวิทยาลัยยามากูชิ เมืองยามากูชิ ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความอนุเคราะห์และช่วยเหลือไว้ ณ โอกาสนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณนิสิตทุกคนที่มีส่วนร่วมในการทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผศ. ดร. กัญจนา ชีระกุล

เมธีวิจัย สกว. รุ่นที่ 2

มีนาคม 2542

บทคัดย่อ

เชื้อกรดน้ำส้ม หรือ acetic acid bacteria เป็นเชื้อที่มีบทบาทในอุตสาหกรรมการผลิตกรดน้ำส้ม เนื่องจากสามารถออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดน้ำส้ม โดยอาศัยเอนไซม์ 2 ชนิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ คือ alcohol dehydrogenase (ADH) และ aldehyde dehydrogenase (ALDH) นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการผลิต biopolymer เช่น เซลลูโลส จากการศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยาและพันธุศาสตร์ของเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 129 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานของญี่ปุ่น (IFO strains) จำนวน 15 สายพันธุ์ พบว่ามีเชื้อสายพันธุ์ไทยที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 40°C จำนวน 51 ไอโซเลต และสายพันธุ์ญี่ปุ่นที่เจริญได้ที่อุณหภูมิเดียวกัน 8 สายพันธุ์ จากการคัดเลือกเชื้อโดยอาศัยสมบัติทางสรีรวิทยาและความสามารถในการผลิตกรดที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกได้จากสับปะรดและองุ่น คือ KU108 และ KU112 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดน้ำส้มได้ดีที่อุณหภูมิสูงและทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม (3%) และเอทานอล (8%) ได้ดีที่สุด ซึ่งจากการจำแนกเชื้อโดยอาศัยสมบัติทางชีวเคมี พบว่า KU108 และ KU112 เป็นสายพันธุ์ *Acetobacter pasteurianus*

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ทั้งสายพันธุ์ของไทยและญี่ปุ่น มีพลาสมิดที่มีขนาดเล็กอยู่เป็นจำนวนมาก ระหว่าง 1-10 พลาสมิด ส่วนการศึกษาการกระจายของ insertion sequence, IS1380 ซึ่งเป็นชิ้น DNA ที่แทรกเข้าไปตรงยีน alcohol dehydrogenase (*adh* gene) ในเชื้อกรดน้ำส้ม ปรากฏว่าตรวจพบ IS1380 ทั้งในเชื้อของไทยและญี่ปุ่นที่โครโมโซมและพลาสมิดขนาดใหญ่ แทบไม่พบสัญญาณไฮบริดกับพลาสมิดขนาดเล็กที่มีอยู่หลายชนิด ซึ่งในจำนวนนี้มีสายพันธุ์ที่พบสัญญาณไฮบริดที่ชัดเจนจำนวน 17 ไอโซเลต (ประมาณ 13% ของเชื้อทั้งหมด) ส่วนสายพันธุ์ของญี่ปุ่นจำนวน 15 สายพันธุ์ ตรวจพบสัญญาณไฮบริดที่ชัดเจนใน 6 สายพันธุ์ (ประมาณ 40% ของเชื้อทั้งหมด) โดยการที่ตรวจพบสัญญาณไฮบริดที่ชัดเจนนี้ แสดงว่าเชื่อดังกล่าวมี IS1380 หรือมี DNA ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ IS1380 จำนวนหลายชุด (multicopies) โดยสายพันธุ์ที่พบว่ามี IS1380 หลายชุดนั้น แสดงว่ายีน *adh* ถูก inactivated และไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลความเข้มข้นสูง (8%) ที่อุณหภูมิ 37°C และไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดความเข้มข้นสูง (3%) ทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 37°C

จากการศึกษาบทบาทของพลาสมิดในเชื้อกรดน้ำส้ม *A. pasteurianus* KU108 โดยการทำให้ plasmid curing ด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ acridine orange ความเข้มข้น 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato medium พบว่าสามารถแยก curant ที่แทบไม่มีพลาสมิดเลยได้ทั้งสิ้น 3 โคโลนี โดย curant ทั้ง 3 โคโลนีที่แยกได้มีสมบัติต่างๆคล้ายกับ parent strain เช่น การทำให้เกิด overoxidation การเจริญที่อุณหภูมิ 40°C การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี เอทานอลผสมอยู่ 8% ที่อุณหภูมิ 37°C การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดน้ำส้มผสมอยู่ 3% ที่อุณหภูมิ 30°C และลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การสร้างกรดในอาหารเหลวที่มีเอทานอลผสมอยู่ 4% และ 8% ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40°C

กิจกรรมของเอนไซม์ ADH และ ALDH ที่เตรียมจาก membrane fraction ของเชื้อที่เลี้ยงใน static culture สูงกว่า shaking culture และการทำ heme staining ของเอนไซม์ ADH (subunit II หรือ cytochrome c complex) ก็ให้ผลสอดคล้องกันคือ ในปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน แแถบของเอนไซม์ที่แยกจาก static culture มีความเข้มข้นสูงกว่าจาก shaking culture และกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลผสมอยู่จะสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเอทานอลหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดน้ำส้มผสมอยู่ แต่เมื่อทำ heme staining ของเอนไซม์ในสภาวะดังกล่าว ปรากฏว่าความเข้มของแถบโปรตีนใกล้เคียงกันมาก แสดงว่าปริมาณของเอนไซม์ที่ membrane fraction ของเชื้อดังกล่าวใกล้เคียงกัน แต่ต่างกันที่กิจกรรมของเอนไซม์ซึ่งอธิบายได้ว่าในสภาวะที่ไม่มีเอทานอลหรือในสภาวะที่มีกรดน้ำส้ม (low pH) จะพบเอนไซม์ ADH ในรูปของ inactive form ในอัตราส่วนที่สูงกว่าในสภาวะที่มีเอทานอล และจากการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองในเชื้อกรดน้ำส้ม 10 ไอโซเลต พบว่าเอนไซม์ที่แยกจาก *A. pasteurianus* KU108 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ซึ่งจากการศึกษาความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงของเอนไซม์ทั้งสองจาก 10 ไอโซเลตข้างต้น โดยการ treat ที่อุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 40, 50, 60 และ 70°C นาน 10 นาที พบว่าที่ 70°C ตรวจพบ residual activity ของเอนไซม์ ADH (3~4%) เฉพาะจากเอนไซม์ที่แยกจาก *A. pasteurianus* KU108 เท่านั้น ส่วนที่สภาวะเดียวกันสำหรับเอนไซม์ ALDH พบ residual activity (3~4%) ใน *A. pasteurianus* KU108 ไอโซเลต KU111 KU112 และ saeki

จากการวิเคราะห์ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่ทนและสายพันธุ์ที่ไวต่ออุณหภูมิสูง โดยใช้ random primers ทั้งหมด 51 primers พบว่ามีเพียง primer เดียว คือ AD01 (5'-CAAAGGGCGG-3') ที่สามารถสลับขยายได้ชิ้น DNA ที่เป็นลักษณะเฉพาะของกลุ่มที่ทนอุณหภูมิสูงและไม่พบในกลุ่มที่ไวต่ออุณหภูมิ คือ ชิ้น DNA ขนาด 1.0 และ 1.3 กิโลเบส ซึ่งชิ้น DNA ทั้งสองนี้อาจใช้เป็น DNA marker ของการทนอุณหภูมิสูง ผู้วิจัยได้ subclone ชิ้น DNA ทั้งสองเข้าสู่ pGEM®-T Easy vector เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ทั้งสองต่อไป

ABSTRACT

Acetic acid bacteria plays a role in vinegar industry because of its ability to oxidize ethanol to acetic acid by two membrane bound enzymes; alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH). Moreover, it also involve in biopolymer production such as cellulose. Studies on physiological and genetic characteristics of 129 isolates from various fruits in Thailand and 15 IFO strains from Japan showed that 51 isolates and 8 strains from Thailand and Japan, respectively can grow at 40°C. Two isolates designated as KU108 and KU112 isolated from pineapple and grape were selected due to their abilities to produce acetic acid at high temperature and their high toleration to acetic acid (3%) and ethanol (8%). According to classification based on biochemical characteristics these two isolates are identified as *Acetobacter pasteurianus*.

Analysis of genetic diversity showed that most of the new isolates and IFO strains harbor many small plasmids inside the cells ranging from 1 to >10 plasmids. Studies on distribution of insertion sequence, IS1380, inserted into alcohol dehydrogenase gene indicated that IS1380 was found on chromosome and large plasmid but not on small plasmid. Strong hybridization signals were detected in 17 Thai isolates (13% of total isolates) and 6 IFO strains (40% of total strains). This strong hybridization signals implicated that these bacteria harbor IS1380 or DNA containing multicopies of IS1380 homologs resulted in an inactivation of *adh* gene. So these isolates could not grow in a medium containing 8% ethanol at 37°C and in a medium containing 3% acetic acid both at 30 and 37°C.

In order to study a role of plasmid in *A. pasteurianus* KU108, plasmid curing was done by sodium dodecyl sulfate (SDS) and acridine orange treatments in potato medium. Three curants possess no plasmid were obtained and all of them showed similar growth characteristics to the parent strain such as overoxidation, growth at 40°C, growth in a medium containing 8% ethanol at 37°C, growth in a medium containing 3% acetic acid at 30°C, electron microscopic appearance and acetic acid production at 30, 37 and 40°C.

Enzyme activities of ADH and ALDH prepared from membrane fraction of a culture grown in static culture was higher than the one obtained from shaking culture. Moreover, heme staining of subunit II or cytochrome c subunit of ADH also showed that with the same amount of protein, a heme staining band of ADH from static culture was darker than the one from shaking culture. Enzyme activities of ADH and ALDH from culture grown in a medium containing ethanol was also higher than that from a culture grown in a medium with no ethanol or containing acetic acid. However, a heme staining band of ADH from membrane fraction of both cultures showed a same intensity. One reason for this phenomenon may be due to an

inactivation of ADH protein from active to inactive form in the cultures grown in an ethanol free medium or in medium containing acetic acid (low pH). Comparison of enzyme activities from 10 thermotolerant isolates from Thailand indicated that the highest activities of both ADH and ALDH were obtained from *A. pasteurianus* KU108. Studies on stability of these enzymes at 30, 40, 50, 60 and 70°C for 10 minutes showed that at 70°C, 3-4% residual activity of ADH was obtained only in membrane fraction of *A. pasteurianus* KU108. At the same condition, 3-4% residual activity of ALDH were obtained from membrane fractions of KU108, KU111, KU112 and saeki.

Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) was used to investigate the genetic variations between thermotolerant and thermosensitive strains. Among 51 random primers only one primer known as AD01 (5'-CAAAGGGCGG-3') could random amplify two specific DNA bands of 1.0 and 1.3 kb only with DNA isolated from thermotolerant strains. These two DNA bands may be a DNA marker of thermotolerance. Subcloning of these two DNA fragments into pGEM®-T Easy and nucleotide sequencing is in progress.

แผนดำเนินงานตลอดโครงการ 3 ปี

↔ = แผนงานที่เสนอจะทำ

— = แผนงานที่ทำเสร็จแล้ว

การดำเนินงาน	ปีที่ 1		ปีที่ 2		ปีที่ 3	
	เดือนที่	เดือนที่	เดือนที่	เดือนที่	เดือนที่	เดือนที่
	1-6	7-12	1-6	7-12	1-6	7-12
1. การศึกษา plasmid profile						
1.1 คัดเลือกและจัดกลุ่มสายพันธุ์ที่มีอยู่เป็นกลุ่มทนและไม่ทนอุณหภูมิสูง	↔					
1.2 แยกสกัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ข้างต้น	↔	↔				
2. การทำ RAPD ของ total DNA						
2.1 ออกแบบและเตรียม DNA primer	↔					
2.2 ทำปฏิกิริยา PCR และวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ทนและไม่ทนอุณหภูมิสูง	↔	↔				
3. การตรวจหา Insertion sequence						
3.1 แยกสกัดดีเอ็นเอและเตรียม DNA probe		↔				
3.2 ทำ Southern hybridization และวิเคราะห์ผล			↔	↔		
4. การทำ plasmid curing						
4.1 เลือกใช้สารที่เหมาะสม			↔			
4.2 วิเคราะห์สมบัติของ curant ที่ได้				↔	↔	
5. การปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม						
5.1 ศึกษาการสร้างกรดที่สภาวะต่างๆของสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง					↔	↔
5.2 ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (adh)					↔	↔
5.3 การโคลนยีน adh					↔	↔

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
รายงานประจำปีปีที่ 1	1
รายงานประจำปีปีที่ 2	22
รายงานประจำปีปีที่ 3	50
รายงานการเงิน	61
output ที่ได้	66

1. Saeki, A., G. Theeragool, K. Matsushita, H. Toyama, N. Lotong and O. Adachi. 1997. Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. Biosc. Biotech. Biochem. 61:138-145.
2. Saeki, A., M. Taniguchi, K. Matsushita, H. Toyama, G. Theeragool, N. Lotong and O. Adachi. 1997. Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation. Biosc. Biotech. Biochem. 61:317-323.
3. Theeragool, G, W. Jaiwisuthunsa, N. Lotong, H. Toyama, K. Matsushita and O. Adachi. 1999. Plasmid Profile and distribution of IS1380 in thermotolerant acetic acid bacteria isolated in Thailand. Biosc. Biotech. Biochem (submitted)

Executive Summary

จากการศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยาและพันธุกรรมของเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกได้ในประเทศไทย จำนวน 129 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานของญี่ปุ่น (IFO strains) จำนวน 15 สายพันธุ์ ปรากฏว่า พบเชื้อสายพันธุ์ไทยที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 40°C จำนวน 51 ไอโซเลท และสายพันธุ์ญี่ปุ่นที่เจริญได้ 8 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีขรุขระ (rough colony, Ro) หรือโคโลนีเรียบที่มีเมือก อันเนื่องมาจากการสร้างสารโพลีแซคคาไรด์ ทำให้ได้ข้อสังเกตว่าเชื้อกรดน้ำส้มที่สร้างสารโพลีแซคคาไรด์จะทนอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่สร้างสารโพลีแซคคาไรด์ ส่วนเชื้อที่ทนทั้งอุณหภูมิสูงและความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม 3% ได้ มีจำนวนทั้งสิ้น 11 ไอโซเลท คือ KU92, KU102, KU105, KU108, KU110, KU112, KU113, KU114, KU115, KU116 และ KU117 ส่วนเชื้อสายพันธุ์ของญี่ปุ่นมีเพียงสายพันธุ์เดียวคือ IFO12467 ที่สามารถทนทั้งอุณหภูมิสูงและความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม 3% ได้ ส่วนการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลความเข้มข้นเริ่มต้น 8% นั้น พบว่าส่วนใหญ่มีเฉพาะสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยเท่านั้นที่เจริญได้ในสภาวะดังกล่าว จากการคัดเลือกเชื้อโดยอาศัยสมบัติทางสรีรวิทยาดังกล่าวข้างต้นและผลการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าเชื้อกรดน้ำส้ม *A. lovaniensis* KU108 และ KU112 เป็นสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงและทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม (3%) และเอทานอล (8%) ได้ดีที่สุด

การศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อดังกล่าวทั้งหมดข้างต้น โดยการแยกสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดภายในเซลล์ (โครโมโซมและพลาสมิด) แล้ววิเคราะห์ในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ปรากฏว่าเชื้อส่วนใหญ่ทั้งสายพันธุ์ของไทยและญี่ปุ่น มีพลาสมิดอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพลาสมิดที่มีขนาดเล็ก และพลาสมิดเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมในเชื้อกลุ่มนี้ นอกจากนี้พลาสมิดดังกล่าวอาจนำมาใช้เป็น cloning vector ในเชื้อกลุ่มนี้ได้อีกด้วย จากการศึกษาการกระจายของ IS1380 ในเชื้อกรดน้ำส้ม ปรากฏว่าตรวจพบ IS1380 ในเชื้อกรดน้ำส้มสายพันธุ์ไทยทั้งสิ้น 36 ไอโซเลท (ประมาณ 27.90% ของเชื้อทั้งหมด) โดยสัญญาณไฮบริดซ์ส่วนใหญ่ที่ตรวจพบทั้งในเชื้อของไทยและญี่ปุ่นจะพบที่โครโมโซมและพลาสมิดขนาดใหญ่ แทบไม่พบสัญญาณไฮบริดซ์กับพลาสมิดขนาดเล็กที่พบว่ามีอยู่มากมายหลายชนิด ซึ่งในจำนวนนี้มีสายพันธุ์ที่พบสัญญาณไฮบริดซ์ที่ชัดเจนจำนวน 17 ไอโซเลท คือ KU11, KU13, KU44, KU48, KU55, KU556, KU62, KU79, KU84, KU85, KU94, KU95, KU96, KU97, KU100 และ KU101 ส่วนสายพันธุ์ของญี่ปุ่นจำนวน 15 สายพันธุ์ ตรวจพบสัญญาณไฮบริดซ์ที่ชัดเจนใน 6 สายพันธุ์ และเชื้อที่พบสัญญาณไฮบริดซ์ที่ชัดเจนมักจะไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอล ความเข้มข้นสูง(8%) ที่อุณหภูมิ 37°C และไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดน้ำส้มความเข้มข้นสูง(3%) ทั้งที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C

แผนดำเนินงานตลอดโครงการ 3 ปี

การดำเนินงาน	ปีที่ 1		ปีที่ 2		ปีที่ 3	
	เดือนที่1-6	เดือนที่7-12	เดือนที่1-6	เดือนที่7-12	เดือนที่1-6	เดือนที่7-12
1. การศึกษา plasmid profile						
1.1 คัดเลือกและจัดกลุ่มสายพันธุ์ที่มีอยู่เป็นกลุ่มทนและไม่ทนอุณหภูมิสูง	↔					
1.2 แยกสกัดดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ข้างต้น วิเคราะห์ในอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟเรซิสและเปรียบเทียบผลที่ได้	↔	↔				
2. การทำ RAPD ของ DNAจากเชื้อกรดน้ำส้ม						
2.1 การออกแบบและเตรียม DNA primer	↔					
2.2 การทำปฏิกิริยา PCR และวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ทนและไม่ทนอุณหภูมิสูง	↔	↔				
3. การตรวจหา Insertion sequence						
3.1 แยกสกัดดีเอ็นเอและเตรียม DNA probe		↔				
3.2 ทำ Southern hybridization และวิเคราะห์ผล			↔	↔		
4. การทำพลาสมิดคิวริง (plasmid curing)						
4.1 การเลือกใช้สารที่เหมาะสมในการทำ plasmid curing			↔			
4.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของ curant ที่ได้				↔	↔	
5. การปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม					↔	↔

↔ = แผนงานที่เสนอจะทำ
 — = แผนงานที่ทำเสร็จแล้ว

ผลงานวิจัยที่ทำในรอบปี

(1) วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยาเบื้องต้นที่สำคัญของเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกได้ในประเทศไทย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของญี่ปุ่นที่ผ่านการคัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์แล้ว เช่น

การเจริญที่อุณหภูมิ 40°C เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง หรือ thermotolerant strains การทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม 3% เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้มได้สูง

การทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของเอทานอล 8% เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนความเข้มข้นเริ่มต้นของเอทานอลได้สูง

การเกิด overoxidation เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่เกิด overoxidation ซึ่งเป็นการออกซิไดซ์กรดน้ำส้มที่สร้างขึ้นเป็น คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ทำให้ได้เปอร์เซ็นต์ของกรดน้ำส้มต่ำลง

ลักษณะการเจริญแบบ static growth ในอาหารเหลว เพื่อตรวจสอบการสร้างสารโพลีแซคคาไรด์ หรือเซลลูโลส

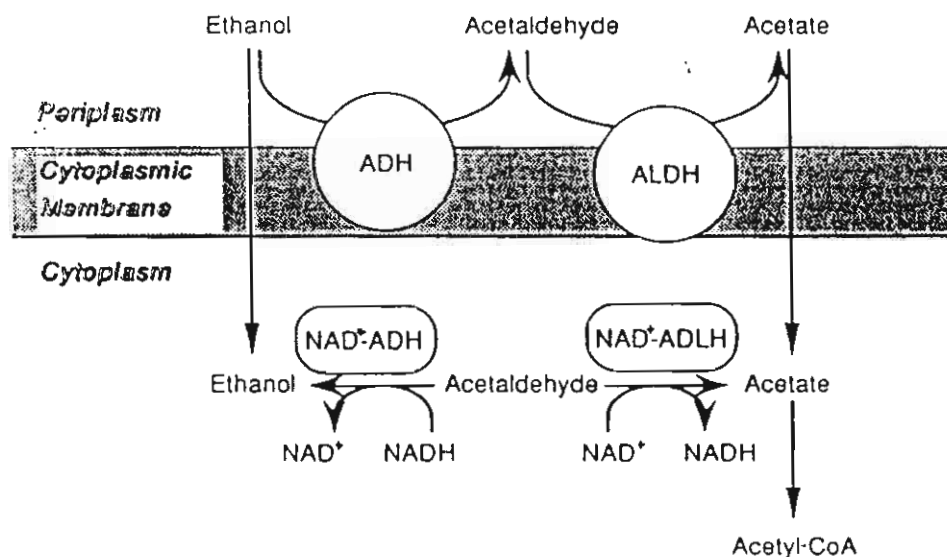
1.2 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อที่แยกได้ข้างต้น โดยวิเคราะห์ plasmid profiles ของเชื้อแต่ละไอโซเลท

1.3. เพื่อศึกษาการกระจายของ Insertion Sequence, IS1380 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ได้ และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เชื้อกรดน้ำส้มสูญเสียสมบัติในการออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดน้ำส้ม

(2) การดำเนินงานในรอบปีที่ผ่านมา

2.1 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นทางสรีรวิทยาที่สำคัญของเชื้อกรดน้ำส้ม

เชื้อกรดน้ำส้ม เป็นเชื้อที่มีบทบาทในอุตสาหกรรมการผลิตกรดน้ำส้ม หรือน้ำส้มสายชู เนื่องจากสามารถออกซิไดซ์เอทานอล ให้เป็นกรดน้ำส้ม โดยอาศัยเอนไซม์สองชนิดคือ alcohol dehydrogenase และ aldehyde dehydrogenase (Ameyama and Adachi, 1982a,b) ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยทั่วไป เชื้อกรดน้ำส้มจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30°C การที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย จะมีผลทำให้อัตราการเจริญและประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์เอทานอลต่ำลง และถือว่า เชื้อกรดน้ำส้มที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C หรือสูงกว่า เป็นเชื้อที่ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant หรือ thermophilic strains) การศึกษาสมบัติการทนอุณหภูมิสูง ทนต่อความเข้มข้นของอัลกอฮอล์ และกรดน้ำส้ม จึงเป็นสมบัติเบื้องต้นทางสรีรวิทยาที่สำคัญและนำมาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อในกลุ่มนี้



ภาพที่ 1 ระบบการออกซิไดซ์เอทานอลในเชื้อกรดน้ำส้ม โดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH) และ aldehyde dehydrogenase (ALDH) ที่เป็น quinoprotein จะฝังตัวอยู่ในชั้น outer membrane ในขณะที่เอนไซม์ alcohol dehydrogenase (NAD⁺-ADH) และ aldehyde dehydrogenase (NAD⁺-ALDH) ที่เป็น NAD⁺-dependent จะอยู่ใน cytoplasm

ที่มา : Matsushita et al., Adv. Microb. Physiol. 36 : 247-301.

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสมบัติเบื้องต้นทางสรีรวิทยาที่สำคัญของเชื้อกรดน้ำส้ม 129 ไอโซเลท ซึ่งส่วนใหญ่แยกจากผลไม้ต่าง ๆ จำนวน 13 ชนิด คือ กล้วย (banana) ฝรั่ง (guava) มะไฟ (rambeh) สับปะรด (pineapple, pineapp) ส้ม (orange) เชอร์รี่ (cherry) ลิ้นจี่ (lychee) มังคุด (mangosteen, mangost) ชมพู (roseapple, roseapp) องุ่น (grape) แตงโม (watermelon, waterme) กระท้อน (santol) และลองกอง (longkon) เปรียบเทียบกับเชื้อกรดน้ำส้มสายพันธุ์ของญี่ปุ่น 15 สายพันธุ์ โดยสมบัติเบื้องต้นทางสรีรวิทยาที่สำคัญที่ทำการศึกษาคือ

1. การศึกษาลักษณะโคโลนีและการเกิด overoxidation หรือ acetate oxidation โดยดูจากการเปลี่ยนสีโคโลนีบนอาหาร seed culture (ที่มีเอทานอล 1% และ bromcresol purple 0.003%) จากสีเหลืองเป็นสีม่วง ซึ่งแสดงว่ามีการออกซิไดซ์กรดน้ำส้มที่สร้างขึ้นต่อไป ทำให้ความเป็นกรดลดลง bromcresol purple จึงเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วง
2. การศึกษาลักษณะการเจริญแบบ static growth ในอาหารเหลว เพื่อตรวจสอบการสร้างสารโพลีแซคคาไรด์ หรือเซลลูโลส โดยดูการเจริญในอาหารเหลว potato extract หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน โดยไม่มีการเขย่า

3. การศึกษาการเจริญที่อุณหภูมิ 40°C โดยดูการเจริญในอาหารเหลว potato extract (0.5% glucose, 1.0% yeast extract, 1.0% polypeptone and 15% potato extract) หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 3 วัน ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบ/นาที

4. การศึกษาการทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม 3% ที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C โดยดูการเจริญบนอาหาร seed culture (0.5% glucose, 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.5% glycerol and 1.5% agar) ที่ใส่กรดน้ำส้มลงไปให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 3% หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C เป็นเวลา 3 วัน

5. การศึกษาการทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของเอทานอล 8 % ที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C โดยดูการเจริญบนอาหาร seed culture ที่ใส่เอทานอลลงไปให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 8% หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C เป็นเวลา 3 วัน

2.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อกรดน้ำส้ม

จากรายงานความไม่เสถียรทางพันธุกรรมของเชื้อกรดน้ำส้ม(Ohmori *et al.*, 1982; Okumura *et al.*, 1985) การพบความหลากหลายของพลาสมิด(Fukaya *et al.*, 1985; Mariette *et al.*, 1991) รวมทั้งการพบดีเอ็นเอซึ่งเคลื่อนที่ได้(mobile DNA) ที่เรียกว่า insertion sequence เช่น IS1031 ในเชื้อ *A. xylinum* ซึ่งเป็นสาเหตุให้เชื้อสูญเสียความสามารถในการสร้างเซลล์ลอส(Coucheron, 1991) และ IS1380 ในเชื้อ *A. pasteurianus* ซึ่งเป็นสาเหตุให้เชื้อสูญเสียความสามารถในการออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดน้ำส้ม(Takemura *et al.*, 1991) ผู้วิจัยจึงศึกษาความหลากหลายของพลาสมิดในเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกได้ในประเทศไทย หรือที่เรียกว่า plasmid profile analysis ซึ่งสามารถใช้เป็นลักษณะทางพันธุกรรมในการกำกับสายพันธุ์ต่างๆ และเป็นพื้นฐานในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสรีรวิทยาและสารพันธุกรรมที่มีอยู่ในเซลล์ รวมทั้งการศึกษาบทบาทของพลาสมิดที่อยู่ภายในเซลล์

การแยกสกัดดีเอ็นเอทั้งหมด

ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกได้ในประเทศไทย จำนวน 129 ไอโซเลท และสายพันธุ์มาตรฐานของยีสต์ (IFO strains) จำนวน 15 สายพันธุ์ โดยวิธี Alkaline hydrolysis ดังขั้นตอนต่อไปนี้

เลี้ยงเชื้อกรดน้ำส้มในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato extract medium โดยการเขย่าที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมง เติมน้ำเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดปั่นขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ นำตะกอนเซลล์มา resuspend ใน solution I (50 mM Tris-Cl pH 8.0 และ 10 mM EDTA pH 8.0) ผสมให้ suspension เป็นเนื้อเดียวกัน เติม 40 ไมโครลิตร ของ lysozyme solution (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของผงไลโซไซม์ใน solution I) เขย่าให้เข้ากันดี บ่มที่ 37°C นาน 30 นาที เติม 200 ไมโครลิตร ของ solution II (0.2N NaOH และ 1% SDS) เขย่าเบาๆให้เข้ากัน แล้วแช่ในน้ำ

แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที เติม 150 ไมโครลิตร ของ solution III (5.0M potassium acetate 60 มิลลิลิตร glacial acetic acid 11.5 มิลลิลิตร และ distilled water 28.5 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากัน แล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที ปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เพื่อแยกเศษเซลล์ สารโพลีแซคคาไรด์และตะกอนสิ่งปนเปื้อนออกจากสารละลาย ดูดเฉพาะสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม 450 ไมโครลิตร ของสารละลายผสม phenol : chloroform (1:1) เขย่าให้เข้ากัน แล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที ปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เพื่อแยกตะกอนสิ่งปนเปื้อนออกจากสารละลาย ดูดเฉพาะสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ (ถ้าสารละลายส่วนบนมีลักษณะขุ่นขาว ควรเติม 10% CTAB in 0.7M NaCl ลงไป 1 ใน 10 ของปริมาตรรวม เขย่าให้เข้ากัน อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที แล้วสกัดด้วย phenol : chloroform ซ้ำ) เติม absolute ethanol ลงไป 2 เท่าของปริมาตรรวม ผสมให้เข้ากัน แช่ไว้ที่ -80°C ประมาณ 30 นาที ปั่นที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 20-30 นาที เก็บตะกอนของกรดนิวคลีอิก ล้างด้วย 70% ethanol ปั่นตกตะกอนซ้ำ ปล่อยให้ตะกอนแห้งพอประมาณ ละลายตะกอนใน 100 ไมโครลิตร ของ TE buffer+RNase (20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) บ่มที่ 37°C นาน 60 นาที เติม 20% polyethylene glycol 6000 in 2.5 M NaCl ลงไป 60 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แช่น้ำแข็งนาน 60 นาที ปั่นที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 20-30 นาที เก็บตะกอนดีเอ็นเอ ปล่อยให้ตะกอนแห้งพอประมาณ แล้วละลายใน 100 ไมโครลิตรของ 0.3 M sodium acetate pH 5.2 เติม absolute ethanol ที่แช่เย็นจัดลงไป 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ไว้ที่ -80°C ประมาณ 30 นาที ปั่นที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 20-30 นาที เก็บตะกอนดีเอ็นเอ ล้างด้วย 70% ethanol ปั่นตกตะกอนซ้ำ ปล่อยให้ตะกอนแห้งพอประมาณ แล้วละลายใน 40 ไมโครลิตรของ TE buffer เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ -20°C

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมอะกาโรสเจลใน 1x TAE buffer (Tris-acetate buffer) ให้มีความเข้มข้น 0.9 % ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอกับ gel loading buffer (bromophenol blue 0.25% and glycerol 30%) หยดลงในหลุมของเจลอะกาโรสที่เตรียมไว้ นำพิมพ์เจลวางในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มี 1x TAE buffer อยู่เพื่อให้ท่วมเจล แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าแรงเคลื่อน 50 หรือ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 60 หรือ 30 นาที นำเจลไปย้อมสีในสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด ส่องดูภายใต้แสง UV

2.3 การศึกษาการกระจายของ Insertion Sequence, IS1380 โดยวิธี Southern hybridization

การเตรียมดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe)

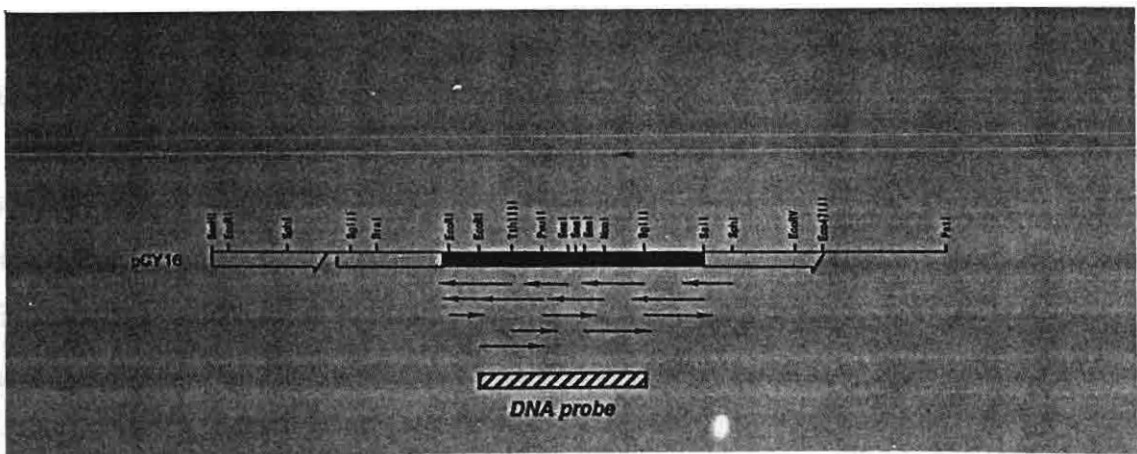
ชิ้นดีเอ็นเอที่นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม เป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.3 กิโลเบส มีสมบัติเป็น Mobile DNA หรือ Insertion Sequence เรียกว่า IS1380 ซึ่งเป็น insertion sequence ชนิดใหม่ที่พบในเชื้อกรดน้ำส้มที่เป็น thermophilic strain (*Acetobacter pasteurianus* NCI1380) และเป็น

insertion sequence ที่แทรกเข้าไปอยู่ตรงกลุ่มยีน *adh* (alcohol dehydrogenase) ในส่วนของ cytochrome c subunit (กลุ่มยีน *adh* ของ *A. pasteurianus* ประกอบด้วย 2 subunits คือ dehydrogenase กับ cytochrome c subunits) ทำให้เมื่อเลี้ยงเชื้อนี้ไปนานๆจะทำให้เกิด spontaneous mutation ทำให้ได้ mutant ที่ไม่สามารถออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดน้ำส้มได้ โดย IS1380 จะแทรกเข้าไปตรงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น TCGA อย่างค่อนข้างจำเพาะเจาะจง

เอนไซม์ alcohol dehydrogenase และ aldehyde dehydrogenase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญมากของเชื้อกรดน้ำส้ม ถ้าเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งถูก inactivated จะมีผลทำให้เชื้อนี้สูญเสียสมบัติที่สำคัญไป ดังนั้นจึงควรตรวจหาการกระจายของ IS1380 ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เอนไซม์ถูก inactivated ในเชื้อกรดน้ำส้มก่อนที่จะมีการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

การแยกบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอที่มี IS1380 ทำได้โดยการตัดพลาสมิด pUCIS1380 (พลาสมิด pUC19 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ IS1380 ขนาดประมาณ 1.3 กิโลเบสแทรกอยู่ตรง *Sma*I site ของ polycloning site) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hind*III ดังแสดงในภาพที่ 2 แยกบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.3 กิโลเบส ออกจากเจลอะกาโรสโดยใช้กระดาษ DE81 นำชิ้นดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์ได้มาติดฉลากด้วย HRP (horseradish peroxidase) โดยวิธี ECL direct system ของ Amersham ดังนี้

ปีเปตสารละลายดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร (ประมาณ 500 นาโนกรัม) ใส่ในหลอดปั่นขนาดเล็ก ต้มสารละลายดีเอ็นเอในน้ำเดือด นาน 5 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที ทิ้งไว้ 5 นาที ปั่นแบบ briefly spin 2-3 วินาที เติมสารละลาย DNA Labelling solution ลงไป 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นแบบ briefly spin 2-3 วินาที เติมสารละลาย glutaraldehyde ลงไป 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นแบบ briefly spin 2-3 วินาที บ่มที่ 37°C นาน 10 นาที แล้วนำมาใช้ทันที หรืออาจเก็บไว้ในน้ำแข็งได้ ประมาณ 10-15 นาที



ภาพที่ 2 แผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction map) ของ insertion sequence, IS1380, ที่แทรกเข้าไปใน cytochrome c ซึ่งเป็น subunit หนึ่งของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ในเชื้อ *A. pasteurianus* NC11380 โดย hatch box แสดงชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็น DNA probe และ ลูกศร แสดง sequencing strategy

ที่มา : Takemura et al., J. Bacteriol. 173 : 7070-7076.

การทำ Southern hybridization

ทำการ transfer ดีเอ็นเอทั้งหมดของเชื้อกรดน้ำส้ม จากเจลอะกาโรสเข้าสู่แผ่น nylon membrane โดยวิธี Southern transfer ดังขั้นตอนต่อไปนี้

แช่แผ่นเจลอะกาโรสในสารละลาย 0.25 N HCl นาน 15 นาที เพื่อไฮโดรไลซ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ เทสารละลาย 0.25 N HCl ทั้ง ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น นำแผ่นเจลอะกาโรสมาแช่ใน denaturing solution นาน 15 นาที เพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายคู่คลายเกลียวเป็นสายเดี่ยว เท denaturing solution ทั้ง ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น นำแผ่นเจลอะกาโรสมาแช่ใน neutralizing solution นาน 15 นาที แล้วนำมาวางบนกระดาษเจลที่วางคว่ำอยู่ในอ่างที่มีสารละลาย 10xSSC(0.15M Na-citrate and 1.5M NaCl pH 7.0) เพื่อทำการ transfer ดีเอ็นเอเข้าสู่แผ่น nylon membrane นำแผ่น nylon membrane ที่ผ่านการทำ Southern transfer มา fix ด้วยแสง UV เพื่อให้ดีเอ็นเอถูกตรึงอยู่ในแผ่น nylon membrane นำแผ่น nylon membrane มาใส่ในถุงพลาสติก (hybridization bag) prehybridize แผ่น nylon membrane ใน hybridizing solution (EC1 hybridization buffer containing 0.5M NaCl and 5.0% blocking agent) ที่ 42°C อย่างน้อย 1 ชั่วโมง เท hybridizing solution เก่าทิ้งไป ใส่ hybridizing solution ที่มี DNA probe ผสมอยู่ลงไป ทำ hybridization ที่ 42°C หนึ่งคืน ล้างแผ่น nylon membrane ด้วย primary washing buffer(0.1xSSC, 0.4% SDS and 6.0M urea) สองครั้ง ละครึ่ง 10 นาที ที่อุณหภูมิ 55°C ล้างแผ่น nylon membrane ซ้ำด้วย secondary washing buffer(2xSSC) สองครั้ง ละครึ่ง 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปลอ่ยให้แห้งตรวจสอบสัญญาณไฮบริไดซ์ (hybridization signal) โดยใช้สารละลายผสมระหว่าง detection reagent 1 และ 2 วาดลงบนแผ่น nylon membrane ปิดทับด้วยพลาสติกใส วางแผ่นฟิล์ม X-ray ทาบลงไป ทำ autoradiograph หนึ่งคืน

(3) ผลที่ได้รับ

3.1 สมบัติเบื้องต้นทางสรีรวิทยาที่สำคัญของเชื้อกรดน้ำส้ม

สมบัติเบื้องต้นทางสรีรวิทยาของเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกได้ในประเทศไทย จำนวน 129 ไอโซเลท และสายพันธุ์ของญี่ปุ่นจำนวน 15 สายพันธุ์ ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้คือ 1) ลักษณะของโคโลนีและการเกิด acetate oxidation 2) ลักษณะการเจริญแบบ static growth ในอาหารเหลว 3) ความสามารถในการเจริญที่ 40°C ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเอทานอลและกรดน้ำส้ม 4) การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดน้ำส้มความเข้มข้นเริ่มต้น 3% ที่อุณหภูมิ 30 และ 37°C 5) การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลความเข้มข้นเริ่มต้น 8% ที่อุณหภูมิ 30 และ 37°C ดังรวบรวมผลไว้ในตารางที่ 1 ปรากฏว่ามีเชื้อสายพันธุ์ไทยที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40°C จำนวน 51 ไอโซเลท ซึ่งในจำนวนนี้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีขรุขระ (rough colony, Ro) หรือโคโลนีเรียบที่มีเมือก อันเนื่องมาจากการสร้างสารโพลีแซคคาไรด์ ทำให้ได้ข้อสังเกตว่าเชื้อกรดน้ำส้มที่สร้างสารโพลีแซคคาไรด์จะทนอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่สร้างสารโพลีแซคคาไรด์ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อที่ทนอุณหภูมิสูงส่วนใหญ่ไม่สามารถทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม 3% ได้ ยกเว้นกลุ่มของเชื้อเดิม (KU102-KU115)

ที่ผ่านการคัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์แล้ว โดยมีเชื้อที่ทนทั้งอุณหภูมิสูงและความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม 3% ได้จำนวนทั้งสิ้น 11 ไอโซเลท คือ KU92, KU102, KU105, KU108, KU110, KU112, KU113, KU114, KU115, KU116 และ KU117 ส่วนเชื้อสายพันธุ์ของญี่ปุ่นมีเพียงสายพันธุ์เดียวคือ IFO12467 ที่สามารถทนทั้งอุณหภูมิสูงและความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม 3% ได้ ในขณะที่เชื้อที่ไม่เจริญที่ 40°C หลายไอโซเลท สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดน้ำส้มความเข้มข้นเริ่มต้น 3% ได้ ส่วนการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลความเข้มข้นเริ่มต้น 8% นั้น พบว่าส่วนใหญ่มีเฉพาะสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยเท่านั้นที่เจริญได้ในสภาวะดังกล่าว

จากการคัดเลือกเชื้อโดยอาศัยสมบัติทางสรีรวิทยาดังกล่าวข้างต้นและผลการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดที่อุณหภูมิต่างๆ (ไม่ได้แสดงผลในรายงานนี้) รวมทั้งผลการวิจัยร่วมกับกลุ่มของ Professor Osao Adachi พบว่าเชื้อกรดน้ำส้ม *A. lovaniensis* KU108 และ KU112 เป็นสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงและผลิตกรดได้ดีที่สุด (Saeki *et al.*, 1996; submitted) จึงคัดเลือกเชื้อนี้มาใช้ในการศึกษาต่อไป รวมทั้งเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมสูงมาก

3.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อกรดน้ำส้ม

จากการวิเคราะห์ plasmid profile ของเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกได้ในประเทศไทย จำนวน 129 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานของญี่ปุ่น จำนวน 15 สายพันธุ์ ปรากฏว่าเชื้อส่วนใหญ่ทั้งสายพันธุ์ของไทยและญี่ปุ่น มีพลาสมิดอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพลาสมิดที่มีขนาดเล็ก ดังแสดงในภาพที่ 3 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Fukaya และคณะ (Fukaya *et al.*, 1985) ซึ่งศึกษาการกระจายและสมบัติของพลาสมิดในเชื้อกรดน้ำส้มสายพันธุ์ของญี่ปุ่นและอเมริกา และ พบว่า เชื้อกรดน้ำส้มส่วนใหญ่จะมีพลาสมิดมากกว่า 1 ชนิด และพลาสมิดเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมในเชื้อกลุ่มนี้ นอกจากนี้พลาสมิดดังกล่าวอาจนำมาใช้เป็น cloning vector ในเชื้อกลุ่มนี้ได้อีกด้วย และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Mariette และคณะ (Mariette *et al.*, 1991) ที่ศึกษา plasmid profile ของเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกจาก wine, spirit และ cider acetator

แต่อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยยังไม่สามารถสรุปบทบาทของพลาสมิดเหล่านี้ได้ในขั้นตอนนี้ ต้องมีการทำ plasmid curing และนำ curant ที่ได้มาวิเคราะห์ต่อไป

Table 1. Lists of acetic acid bacteria isolated in Thailand and their characteristics compared to IFO strains.

Code	Sources	Isolated conditions		Colony/ Overox	Static growth	Growth at 40 °C		Growth in 3% acetic acid		Growth in 8% ethanol/Halos	
		°C,days	Ace/Eth			72 hr	72 hr	30 °C 72 hr	37 °C 72 hr	30 °C 24 hr	37 °C 24 hr
KU1	banana	37,3d	2%/0%	Sm/+	S	-	+	+	+	-/-	-/-
KU2	banana	37,7d	2%/0%	Ro/-	C	++	+	-	-	+/-	+/-
KU3	banana	30,7d	2%/0%	Sm/-	S	-	+	+	+	-/-	-/-
KU4	banana	37,3d	2%/0%	Ro/-	WC	++	-	-	-	+/+	-/-
KU5	banana	30,5d	2%/0%	Ro/-	WC	++	-	-	-	+/+	-/-
KU6	banana	30,7d	2%/0%	Ro/-	WC	++	-	-	-	+/+	-/-
KU7	banana	37,7d	2%/0%	Sm/-	S	-	++	++	++	+/++	-/-
KU8	banana	37,5d	2%/0%	Sm/-	S	+	++	++	++	+/+	+/++
KU9	banana	30,5d	2%/0%	Sm/-	S	-	++	++	++	+/++	-/-
KU10	banana	37,3d	4%/0%	Ro/-	WC	++	-	-	-	-/-	-/-
KU11	banana	37,3d	0%/6%	Ro/-	WC	-	-	-	-	+/++	-/-
KU12	banana	37,7d	0%/6%	Ro/-	WC	++	-	-	-	+/++	-/-
KU13	banana	37,3d	0%/6%	Sm/+	WS	-	-	-	-	+/++	-/-
KU14	banana	37,3d	0%/0%	Ro/+	WS	++	+	+	+	+/++	-/-
KU15	guava	30,3d	2%/0%	Sm/+	S	-	++	++	++	+/++	-/-
KU16	guava	30,5d	2%/0%	Sm/+	S	-	++	++	++	+/++	-/-
KU17	guava	30,3d	2%/0%	Sm/+	S	-	++	++	++	+/++	-/-
KU18	guava	30,7d	2%/0%	Sm/+	WS	-	+	+	+	+/++	-/-
KU19	guava	37,5d	2%/0%	Sm/+	WS	-	+	+	+	+/++	-/-
KU20	guava	37,7d	2%/0%	Sm/+	WS	-	+	+	+	+/++	-/-
KU21	guava	30,5d	4%/0%	Sm/+	WS	-	+	+	+	+/++	+/+
KU22	guava	30,5d	4%/0%	Sm/+	WS	-	+	+	+	+/++	-/-
KU23	guava	30,7d	4%/0%	Ro/+	WC	++	+	+	+	+/+	+/+
KU24	guava	30,7d	4%/0%	Ro/+	WC	-	-	-	-	+/++	-/-
KU25	guava	30,3d	0%/4%	Sm/+	S	-	++	++	++	-/-	-/-
KU26	guava	30,7d	0%/4%	Ro/+	WC	++	-	-	-	-/-	-/-
KU27	guava	30,5d	0%/4%	Sm/-	S	-	-	-	-	+/++	+/+
KU28	guava	30,5d	0%/4%	Sm/-	S	-	-	-	-	+/++	+/+
KU29	guava	30,7d	0%/4%	Sm/-	S	-	-	-	-	-/-	-/-
KU30	guava	37,7d	0%/4%	Ro/-	WS	+	+	+	+	+/+	-/-
KU31	guava	37,7d	0%/4%	Sm/+	WC	-	-	-	-	-/-	-/-
KU32	guava	37,3d	0%/6%	Sm/+	WC	++	-	-	-	-/-	-/-
KU33	guava	37,3d	0%/6%	Sm/-	S	+	+	+	+	+/++	+/++
KU34	guava	37,5d	0%/0%	Ro/+	WC	++	-	-	-	+/+	+/+
KU35	rambeh	37,3d	2%/0%	Ro/+	WS	++	-	-	-	-/-	-/-
KU36	rambeh	30,5d	2%/0%	Sm/-	C	+	+	+	+	+/++	-/-
KU37	rambeh	37,3d	4%/0%	Sm/-	C	+	+	+	+	+/++	-/-
KU38	rambeh	30,3d	4%/0%	Sm/+	WS	++	+	+	+	+/+	+/+
KU39	rambeh	37,7d	0%/4%	Sm/+	WS	++	-	-	-	-/-	-/-
KU40	rambeh	37,3d	0%/4%	Sm/-	S	+	+	+	+	-/-	-/-
KU41	rambeh	37,7d	0%/4%	Sm/+	WC	-	-	-	-	+/+	+/+
KU42	pineapp	30,5d	2%/0%	Sm/+	WS	-	+	+	+	+/++	+/+
KU43	pineapp	30,7d	2%/0%	Sm/-	S	-	++	++	++	+/++	+/++
KU44	pineapp	37,5d	2%/0%	Ro/+	S	+	-	-	-	-/-	-/-
KU45	pineapp	30,3d	4%/0%	Sm/-	S	-	++	++	++	+/+	+/++
KU46	pineapp	30,3d	4%/0%	Sm/-	S	-	++	++	++	-/-	-/-
KU47	pineapp	30,3d	4%/0%	Ro/-	WC	-	-	-	-	+/++	+/+
KU48	pineapp	37,5d	4%/0%	Ro/+	WS	++	-	-	-	+/+	-/-
KU49	pineapp	30,7d	4%/0%	Ro/-	WC	++	-	-	-	+/+	+/+
KU50	pineapp	37,5d	0%/4%	Sm/+	WS	+	-	-	-	+/++	+/++

Table 1. (continued)

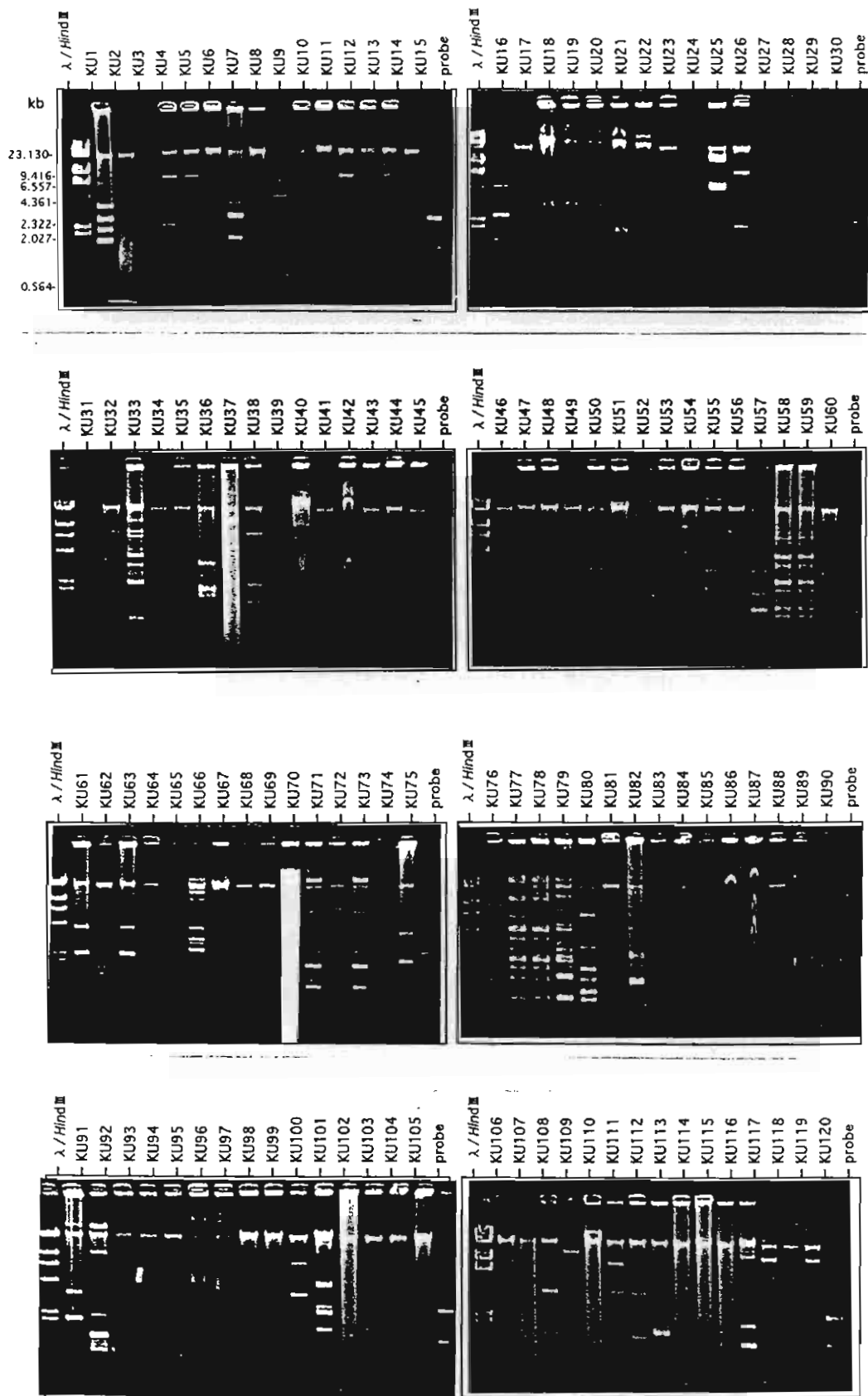
Code	Sources	Isolated conditions		Colony/ Overox	Static growth	Growth at 40 °C		Growth in 3% acetic acid		Growth in 8% ethanol/Halos	
		°C, days	Ace/Eth			72hr	72hr	30 °C 72hr	37 °C 72hr	30 °C 24hr	37 °C 24hr
KU51	pineapp	37,3d	0%/4%	Ro/+	WC	++	-	-	-	+++	+++
KU52	pineapp	30,5d	0%/4%	Sm/+	S	+	+	+	+	+++	+++
KU53	pineapp	37,7d	0%/4%	Ro/+	WC	++	-	-	-	+++	+++
KU54	pineapp	30,5d	0%/4%	Sm/-	WS	+	-	-	-	+++	+++
KU55	pineapp	37,7d	0%/6%	Sm/+	WC	++	-	-	-	+++	+++
KU56	pineapp	37,5d	0%/0%	Sm/+	WC	++	-	-	-	+++	+++
KU57	pineapp	37,5d	0%/0%	Sm/-	WS	-	-	-	-	+++	+++
KU58	orange	37,3d	0%/0%	Sm/+	S	-	++	++	++	+++	+++
KU59	orange	37,5d	0%/0%	Sm/+	WS	-	++	++	++	-/-	-/-
KU60	rambeh	37,3d	2%/0%	Sm/+	S	-	++	++	++	-/-	-/-
KU61	banana	30,3d	0%/4%	Sm/+	S	-	++	++	++	-/-	-/-
KU62	banana	30,3d	0%/4%	Sm/+	S	-	-	-	-	-/-	-/-
KU63	banana	30,3d	0%/4%	Sm/+	S	-	++	++	++	+++	-/-
KU64	banana	30,7d	0%/4%	Sm/+	WS	-	-	-	-	-/-	-/-
KU65	banana	30,7d	0%/4%	Sm/+	WS	-	-	-	-	-/-	-/-
KU66	banana	37,3d	0%/4%	Sm/+	S	-	-	-	-	-/-	-/-
KU67	cherry	30,3d	0%/4%	Sm/+	WS	-	-	-	-	+++	-/-
KU68	cherry	37,3d	0%/4%	Sm/+	S	++	-	-	-	-/-	-/-
KU69	cherry	37,3d	0%/4%	Sm/+	WS	++	-	-	-	-/-	-/-
KU70	guava	30,3d	0%/4%	Ro/-	WC	++	+	+	+	+++	+++
KU71	guava	30,3d	0%/4%	Sm/-	S	-	++	++	++	-/-	-/-
KU72	guava	30,7d	0%/4%	Ro/+	WS	++	-	-	-	+++	+++
KU73	guava	30,7d	0%/4%	Sm/-	S	-	++	++	++	-/-	-/-
KU74	guava	37,7d	0%/4%	Sm/-	S	-	-	-	-	-/-	-/-
KU75	lychee	30,3d	0%/4%	Sm/-	S	+	++	++	++	-/-	-/-
KU76	lychee	37,3d	0%/4%	Sm/-	S	-	-	-	-	-/-	-/-
KU77	mangost	30,7d	0%/4%	Sm/-	S	+	++	++	++	-/-	-/-
KU78	mangost	30,9d	0%/4%	Sm/-	S	+	++	++	++	-/-	-/-
KU79	orange	30,3d	0%/4%	Sm/-	S	+	++	++	++	-/-	-/-
KU80	orange	30,3d	0%/4%	Sm/-	S	-	++	++	++	+++	-/-
KU81	orange	30,3d	0%/4%	Ro/+	WS	++	-	-	-	+++	+++
KU82	orange	37,3d	0%/4%	Sm/+	S	-	++	++	++	+++	-/-
KU83	orange	37,3d	0%/4%	Sm/-	C	-	-	-	-	+++	-/-
KU84	orange	37,7d	0%/4%	Sm/+	WS	++	-	-	-	+++	+++
KU85	orange	37,7d	0%/4%	Sm/+	WS	++	-	-	-	+++	+++
KU86	pineapp	30,3d	0%/4%	Ro/+	WS	++	+	+	+	+++	+++
KU87	pineapp	30,3d	0%/4%	Sm/+	WS	++	+	+	+	+++	+++
KU88	pineapp	30,3d	0%/4%	Sm/+	S	-	+	+	+	+++	-/-
KU89	pineapp	30,7d	0%/4%	Sm/+	S	-	+	+	+	+++	-/-
KU90	pineapp	30,7d	0%/4%	Sm/+	S	-	+	+	+	+++	-/-
KU91	pineapp	37,7d	0%/4%	Sm/-	S	-	++	++	++	+++	-/-
KU92	papaya	30,9d	0%/4%	Sm/-	S	++	++	++	++	+++	-/-
KU93	roseapp	30,3d	0%/4%	Ro/-	WS	++	-	-	-	+++	-/-
KU94	roseapp	30,7d	0%/4%	Sm/-	S	-	-	-	-	+++	-/-
KU95	roseapp	30,7d	0%/4%	Sm/-	S	-	-	-	-	+++	-/-
KU96	roseapp	30,7d	0%/4%	Sm/-	S	-	-	-	-	+++	-/-
KU97	roseapp	30,7d	0%/4%	Sm/+	S	-	+	+	+	+++	-/-
KU98	roseapp	30,7d	0%/4%	Ro/+	WS	++	-	-	-	+++	-/-
KU99	roseapp	30,7d	0%/4%	Ro/+	WS	++	-	-	-	+++	-/-
KU100	roseapp	37,3d	0%/4%	Ro/+	WS	++	-	-	-	+++	-/-

Table 1. (continued)

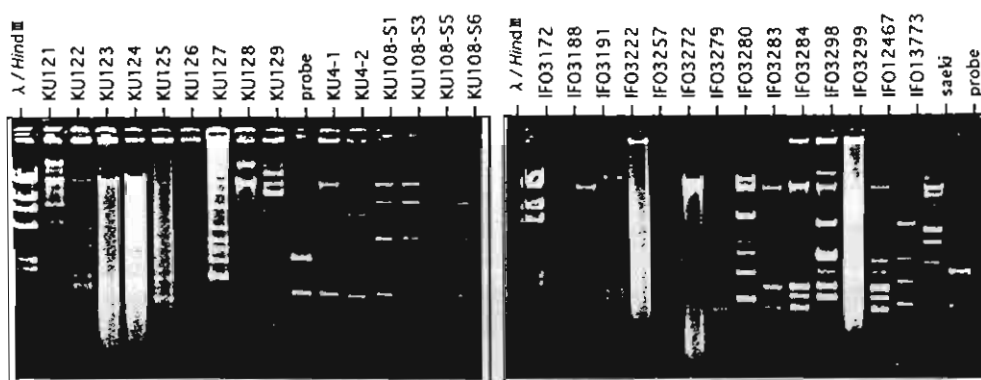
Code	Sources	Isolated condotions		Colony/ Overox	Static growth	Growth at 40°C	Growth in 3% acetic acid		Growth in 8% ethanol/Halos	
		°C, days	Ace/Eth				30°C	37°C	30°C	37°C
KU101	ros capp	37,7d	0%/4%	Sm/-	WS	++	-	-	+/-	-/-
KU102		<i>A. ascendens</i>		Sm/-	WS	++	++	++	++/++	-/-
KU103		<i>A. ascendens</i>		Sm/-	S	+	+	+	++/++	-/-
KU104		<i>A. ascendens</i>		Sm/-	S	++	+	+	++/++	-/-
KU105	grape	<i>A. lovaniensis</i>		Sm/-	S	++	++	++	++/++	-/-
KU106	grape	<i>A. lovaniensis</i>		Sm/-	WS	++	+	+	++/+	-/-
KU107	pineapp	<i>A. rancens</i>		Sm/-	S	+	++	++	+/+	+/+
KU108	pineapp	<i>A. lovaniensis</i>		Sm/-	S	++	++	++	++/++	++/++
KU109	guava	<i>A. aceti</i>		Sm/-	S	nd	++	++	++/++	++/++
KU110		<i>A. xylinum</i>		Sm/-	S	++	++	++	+/+	++/+
KU111	grape	<i>A. lovaniensis</i>		Sm/+	S	++	+	+	++/++	++/++
KU112	grape	<i>A. lovaniensis</i>		Sm/-	WC	++	++	++	++/++	++/++
KU113	grape	<i>A. rancens</i>		Sm/+	S	++	++	++	++/++	++/++
KU114	apple	<i>A. lovaniensis</i>		Sm/+	S	++	++	++	++/++	-/-
KU115	papaya	<i>A. lovaniensis</i>		Sm/+	S	++	++	++	++/++	+/+
KU116	waterme	30,7d	0%/4%	Sm/+	S	++	++	++	++/++	+/+
KU117	waterme	30,9d	0%/4%	Sm/-	S	++	++	++	++/++	++/++
KU118	santol	30,3d	0%/4%	Sm/-	S	+	-	-	++/++	++/++
KU119	santol	30,7d	0%/4%	Sm/-	S	+	-	-	++/++	++/++
KU120	santol	37,7d	0%/4%	Sm/-	S	+	-	-	++/++	++/++
KU121	santol	37,7d	0%/4%	Sm/-	S	-	+	+	++/++	++/++
KU122	longkon	30,3d	0%/4%	Sm/+	S	-	-	-	++/++	+/+
KU123	longkon	37,3d	0%/4%	Sm/-	WC	++	-	-	-/-	++/-
KU124	longkon	37,7d	0%/4%	Ro/-	WC	++	-	-	-/-	++/-
KU125	guava	37,7d	0%/4%	Sm/+	S	-	-	-	+/+	-/-
KU126	lychee	37,3d	0%/4%	Sm/+	S	-	-	-	++/++	-/-
KU127	orange	30,3d	0%/4%	Sm/-	WS	++	+	+	++/++	+/+
KU128	longkon	30,3d	0%/4%	Sm/-	S	+	-	-	++/++	+/-
KU129	santol	30,3d	0%/4%	Sm/-	S	-	-	-	+/+	+/-
IFO strains										
IFO3172		<i>G. suboxydans</i>		Sm/-	C	++	+	+	-/-	-/-
IFO3188		<i>A. acendens</i>		Sm/-	WC	++	+	+	-/-	-/-
IFO3191		<i>A. rancens</i>		Sm/-	WC	++	+	+	+/++	-/-
IFO3222		<i>A. kutzingianum</i>		Sm/-	S	-	+	+	-/-	-/-
IFO3257		<i>G. suboxydans</i>		Sm/-	S	++	-	-	-/-	-/-
IFO3272		<i>G. dioxyceticus</i>		Sm/-	S	++	-	-	+/+	-/-
IFO3279		<i>A. acetigenus</i>		Sm/-	S	++	-	-	-/-	-/-
IFO3280		<i>A. acetinus</i>		Sm/-	WC	+	+	+	-/-	-/-
IFO3283		<i>A. aceti</i>		Sm/+	C	+	+	+	-/-	-/-
IFO3284		<i>A. aceti</i>		Sm/-	WS	++	+	+	-/-	-/-
IFO3298		<i>A. rancens</i>		Sm/-	S	+	++	++	-/-	-/-
IFO3299		<i>A. acendens</i>		Sm/-	S	+	++	++	-/-	-/-
IFO12467		<i>G. sphaericus</i>		Sm/-	S	++	++	++	-/-	-/-
IFO13773		<i>A. xylinum</i>		Sm/-	C	+	+	+	-/-	-/-
sacki		<i>A. xylinum</i>		Sm/+	WC	+	+	+	++/++	+/+

Notes: 1) Sm = Smooth, Ro = Rough, S = Sediment, C = Colloid, WS = White film + Sediment, WC = White film + Colloid

2) growth at 40°C was observed from shaking culture in potato medium



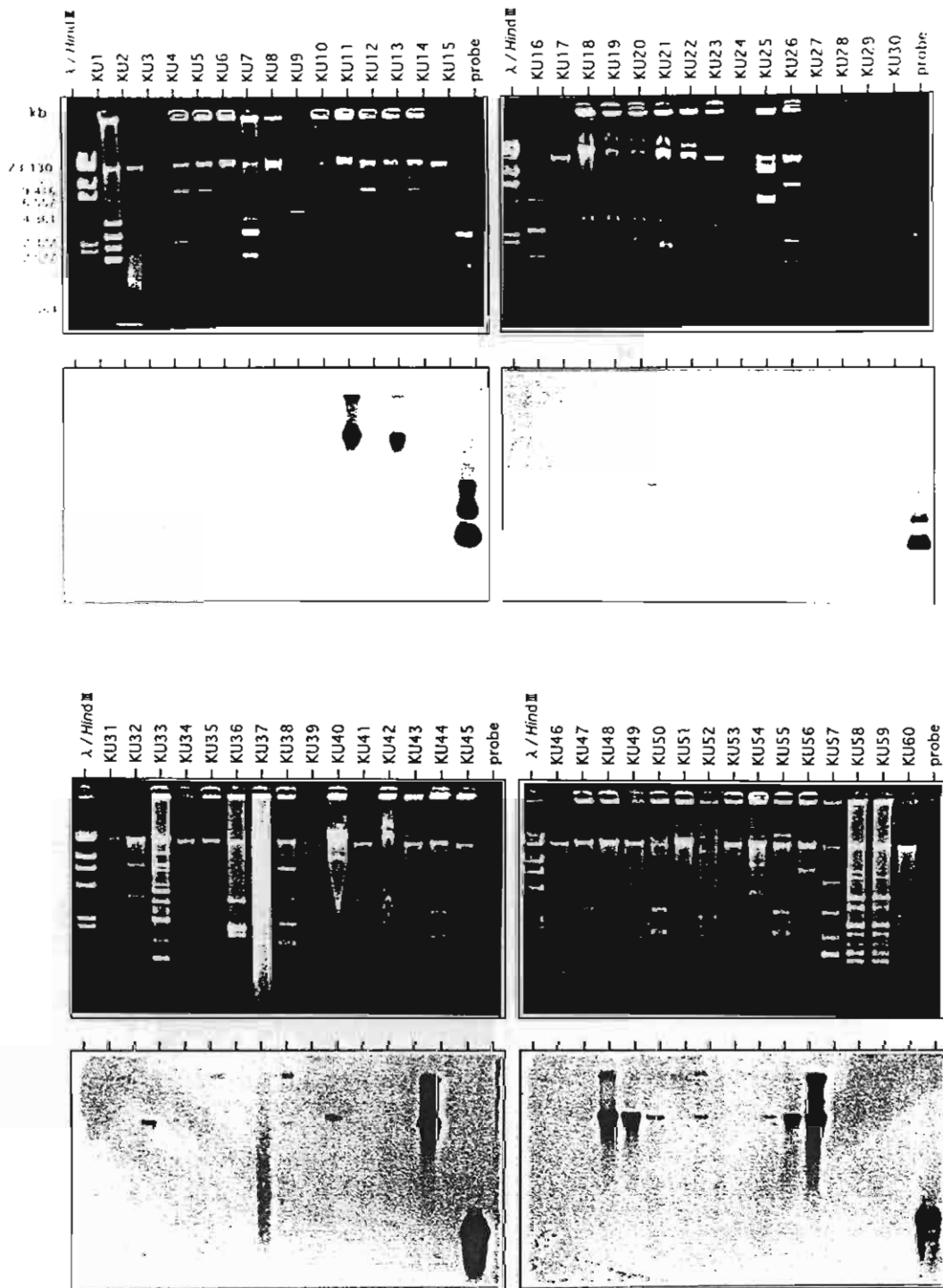
ภาพที่ 3 แสดง plasmid profile ของเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกได้ในประเทศไทย จำนวน 129 ไอโซเลท
เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของญี่ปุ่นจำนวน 15 สายพันธุ์



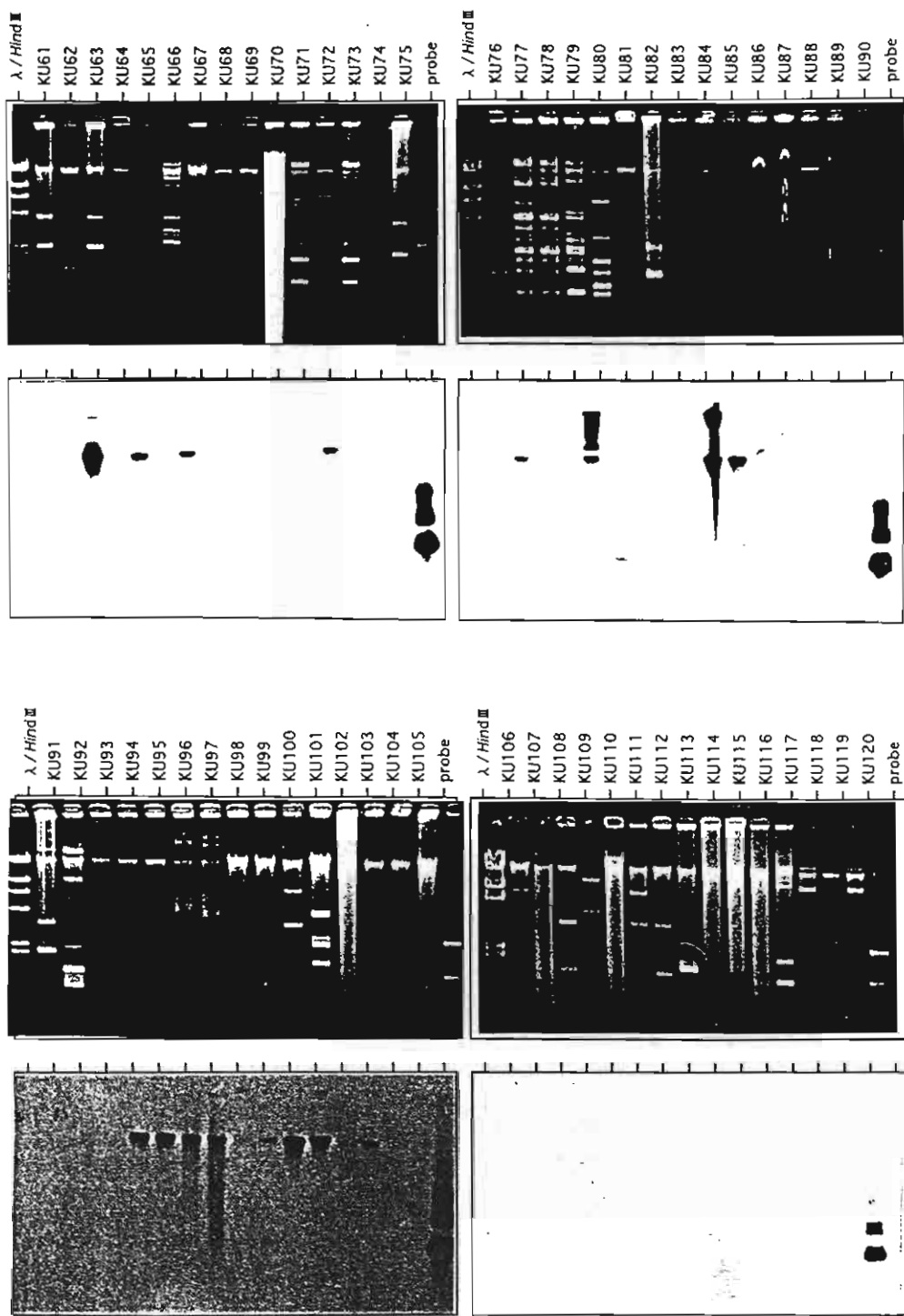
ภาพที่ 3 (ต่อ) แสดง plasmid profile ของเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกได้ในประเทศไทย จำนวน 129 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของญี่ปุ่นจำนวน 15 สายพันธุ์

3.3.การกระจายของ Insertion Sequence, IS1380 ในเชื้อกรดน้ำส้ม

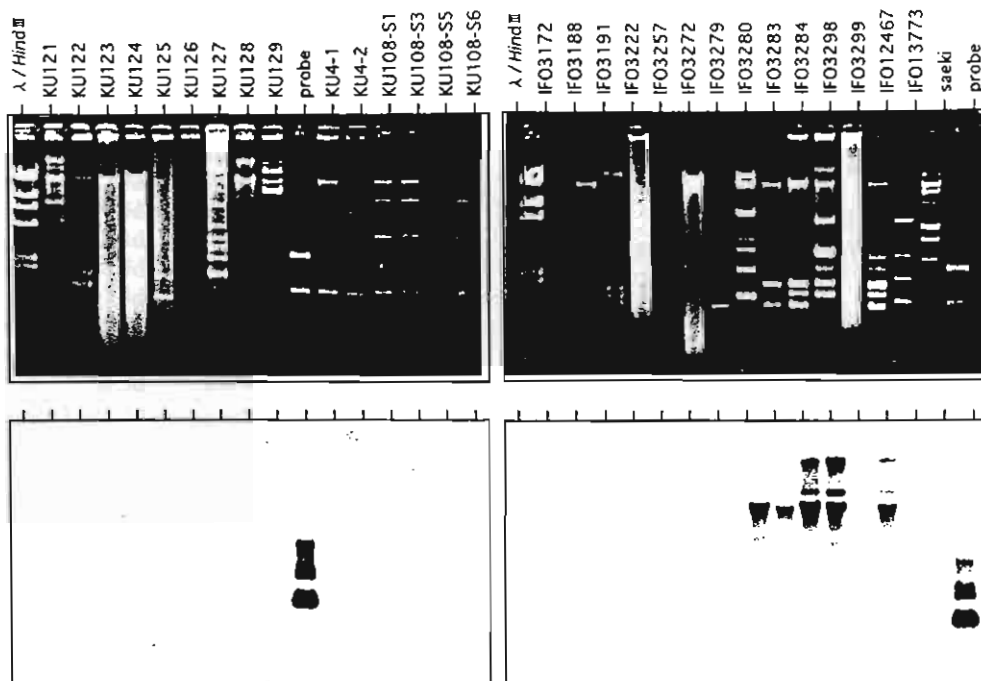
จากการศึกษาการกระจายของ IS1380 ในเชื้อกรดน้ำส้ม พบว่าตรวจพบ IS1380 ในเชื้อกรดน้ำส้มสายพันธุ์ไทยทั้งสิ้น 36 ไอโซเลท (ประมาณ 27.90% ของเชื้อทั้งหมด) ดังแสดงในภาพที่ 4 เป็นที่น่าสังเกตว่า สัญญาณไฮบริดซ์ส่วนใหญ่ที่ตรวจพบทั้งในเชื้อของไทยและญี่ปุ่นจะพบที่โครโมโซมและพลาสมิดขนาดใหญ่ แทบไม่พบสัญญาณไฮบริดซ์กับพลาสมิดขนาดเล็กที่พบว่ามีอยู่มากมายหลายชนิด ซึ่งในจำนวนนี้มีสายพันธุ์ที่พบสัญญาณไฮบริดซ์ที่ชัดเจนจำนวน 17 ไอโซเลท (ประมาณ 13.18% ของเชื้อทั้งหมด) คือ KU11, KU13, KU44, KU48, KU55, KU556, KU62, KU79, KU84, KU85, KU94, KU95, KU96, KU97, KU100 และ KU101 ส่วนสายพันธุ์ของญี่ปุ่นจำนวน 15 สายพันธุ์ ตรวจพบสัญญาณไฮบริดซ์ที่ชัดเจนใน 6 สายพันธุ์ คิดเป็นประมาณ 40 % ของเชื้อที่นำมาตรวจสอบ ดังรวบรวมไว้ในตารางที่ 2 โดยการที่ตรวจพบสัญญาณไฮบริดซ์ที่ชัดเจนนี้แสดงให้เห็นว่าในเชื้อดังกล่าวข้างต้นมี IS1380 หรือมีดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ IS1380 จำนวนหลายชุด (multicopies) นอกจากนี้ สายพันธุ์ที่ตรวจพบว่ามี IS1380 หลายชุดนั้น มักจะไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทธานอล ความเข้มข้นสูง(8%) ที่อุณหภูมิ 37°C และไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดน้ำส้มความเข้มข้นสูง(3%) ทั้งที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C



ภาพที่ 4 แสดงการกระจายของ IS1380 ในเชื้อกรดน้ำส้ม โดยศึกษาจากการทำ Southern hybridization ที่อุณหภูมิ 42°C ระหว่าง total DNA ที่แยกสกัดจากเชื้อกรดน้ำส้ม กับ DNA probe, IS1380 ที่ติดฉลากด้วยสาร peroxidase ตามวิธีของ ECL direct system ของ Amersham



ภาพที่ 4 (ต่อ) แสดงการกระจายของ IS1380 ในเชื้อกรดน้ำส้ม โดยศึกษาจากการทำ Southern hybridization ที่อุณหภูมิ 42°C ระหว่าง total DNA ที่แยกสกัดจากเชื้อกรดน้ำส้ม กับ DNA probe, IS1380 ที่ติดฉลากด้วยสาร peroxidase ตามวิธีของ ECL direct system ของ Amersham



ภาพที่ 4 (ต่อ) แสดงการกระจายของ IS1380 ในเชื้อกรตน้ำส้ม โดยศึกษาจากการทำ Southern hybridization ที่อุณหภูมิ 42°C ระหว่าง total DNA ที่แยกสกัดจากเชื้อกรตน้ำส้ม กับ DNA probe. IS1380 ที่ติดฉลากด้วยสาร peroxidase ตามวิธีของ ECL direct system ของ Amersham

Table 2. Lists of acetic acid bacteria containing insertion sequence, IS1380

Code	Sources	Isolated conditions		Colony/ Overox	Static growth	Growth at 40°C		Growth in 3% acetic acid		Growth in 8% ethanol/Halos	
		°C, days	Ace/Eth			72 hr	72 hr	30°C 72 hr	37°C 72 hr	30°C 24 hr	37°C 24 hr
KU11	banana	37,3d	0%/6%	Ro/-	WC	-	-	-	-	+/++	-/-
KU13	banana	37,3d	0%/6%	Sm/+	WS	-	-	-	-	+/++	-/-
KU32	guava	37,3d	0%/6%	Sm/+	WC	++	-	-	-	-/-	-/-
KU33	guava	37,3d	0%/6%	Sm/-	S	+	+	+	+	+++	+++
KU34	guava	37,5d	0%/0%	Ro/+	WC	++	-	-	-	+/++	+/+
KU35	rambeh	37,3d	2%/0%	Ro/+	WS	++	-	-	-	-/-	-/-
KU37	rambeh	37,3d	4%/0%	Sm/-	C	+	+	+	+	+++	-/-
KU38	rambeh	30,3d	4%/0%	Sm/+	WS	++	+	+	+	+/+	+/+
KU40	rambeh	37,3d	0%/4%	Sm/-	S	+	+	+	+	-/-	-/-
KU44	pineapp	37,5d	2%/0%	Ro/+	S	+	-	-	-	-/-	-/-
KU47	pineapp	30,3d	4%/0%	Ro/-	WC	-	-	-	-	+/++	+/+
KU48	pineapp	37,5d	4%/0%	Ro/+	WS	++	-	-	-	+/+	-/-
KU49	pineapp	30,7d	4%/0%	Ro/-	WC	++	-	-	-	+/+	+/+
KU51	pineapp	37,3d	0%/4%	Ro/+	WC	++	-	-	-	+++	+++
KU54	pineapp	30,5d	0%/4%	Sm/-	WS	+	-	-	-	+++	+++
KU55	pineapp	37,7d	0%/6%	Sm/+	WC	++	-	-	-	+++	+++
KU56	pineapp	37,5d	0%/0%	Sm/+	WC	++	-	-	-	+++	+++
KU62	banana	30,3d	0%/4%	Sm/+	S	-	-	-	-	-/-	-/-
KU64	banana	30,7d	0%/4%	Sm/+	WS	-	-	-	-	-/-	-/-
KU66	banana	37,3d	0%/4%	Sm/+	S	-	-	-	-	-/-	-/-
KU72	guava	30,7d	0%/4%	Ro/+	WS	++	-	-	-	+/++	+/+
KU76	lychee	37,3d	0%/4%	Sm/-	S	-	-	-	-	-/-	-/-
KU79	orange	30,3d	0%/4%	Sm/-	S	+	++	++	++	-/-	-/-
KU82	orange	37,3d	0%/4%	Sm/+	S	-	++	++	++	+++	-/-
KU84	orange	37,7d	0%/4%	Sm/+	WS	++	-	-	-	+++	+/+
KU85	orange	37,7d	0%/4%	Sm/+	WS	++	-	-	-	+/+	+/+
KU94	roseapp	30,7d	0%/4%	Sm/-	S	-	-	-	-	+++	-/-
KU95	roseapp	30,7d	0%/4%	Sm/-	S	-	-	-	-	+++	-/-
KU96	roseapp	30,7d	0%/4%	Sm/-	S	-	-	-	-	+++	-/-
KU97	roseapp	30,7d	0%/4%	Sm/+	S	-	+	+	+	+++	-/-
KU99	roseapp	30,7d	0%/4%	Ro/+	WS	++	-	-	-	+++	-/-
KU100	roseapp	37,3d	0%/4%	Ro/+	WS	++	-	-	-	+++	-/-
KU101	roseapp	37,7d	0%/4%	Sm/-	WS	++	-	-	-	+/+	-/-
KU102		<i>A. ascendens</i>		Sm/-	WS	++	++	++	++	+++	-/-
KU103		<i>A. ascendens</i>		Sm/-	S	+	+	+	+	+++	-/-
KU119	santol	30,7d	0%/4%	Sm/-	S	+	-	-	-	+++	+++
IFO3191		<i>A. rancens</i>		Sm/-	WC	++	+	+	+	+++	-/-
IFO3280		<i>A. acetinus</i>		Sm/-	WC	+	+	+	+	-/-	-/-
IFO3283		<i>A. aceti</i>		Sm/+	C	+	+	+	+	-/-	-/-
IFO3284		<i>A. aceti</i>		Sm/-	WS	++	+	+	+	-/-	-/-
IFO3298		<i>A. rancens</i>		Sm/-	S	+	++	++	++	-/-	-/-
IFO12467		<i>G. sphaericus</i>		Sm/-	S	++	++	++	++	-/-	-/-

Notes: 1) Sm = Smooth, Ro = Rough, S = Sediment, C = Colloid, WS = White film + Sediment,
WC = White film + Colloid

2) growth at 40°C was observed from shaking culture in potato medium

เอกสารอ้างอิง

- Ameyama M, Adachi O. Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. *Methods Enzymol.* 1982a; 89: 450-457.
- Ameyama M, Adachi O. Aldehyde dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. *Methods Enzymol.* 1982b; 89: 491-497.
- Fukaya M, Iwata T, Entani E, Masai H, Uozumi T, Beppu T. Distribution and characterization of plasmids in acetic acid bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 1985; 49: 1349-1355.
- Mariette I, Schwarz E, Vogel R.F, Hammes W.P. Characterization by plasmid profile analysis of acetic acid bacteria from wine, spirit and cider acetators for industrial vinegar production. *J. Appl. Bacteriol.* 1991; 71: 134-138.
- Matsushita K, Toyama H, Adachi O. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 1994; 36: 247-301.
- Ohmori S, Uozumi T, Beppu T. Loss of acetic acid resistance and ethanol oxidizing ability in an *Acetobacter* strain. *Agric. Biol. Chem.* 1982; 46: 381-389.
- Okumura H, Uozumi T, Beppu T. Biochemical characteristics of spontaneous mutants of *Acetobacter aceti* deficient in ethanol oxidation. *Agric. Biol. Chem.* 1985; 49: 2485-2487.
- Saeki A, Theeragool G, Matsushita K, Toyama H, Lotong N, Adachi O. Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. *Biosc. Biotech. Biochem.* 1996 (submitted).
- Saeki A, Taniguchi M, Matsushita K, Toyama H, Theeragool G, Lotong N, Adachi O. Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation. *Biosc. Biotech. Biochem.* 1996 (submitted).
- Takemura H, Horinouchi S, Beppu T. Novel insertion sequence IS1380 from *Acetobacter pasteurianus* is involved in loss of ethanol-oxidizing ability. *J. Bacteriol.* 1991; 173: 7070-7076.

(4) งานที่จะทำต่อไปในอนาคต

- 4.1 ศึกษาและเปรียบเทียบผลการทำ Random Amplified DNA Polymorphism (RAPD) ของเชื้อกลุ่มที่ทนและไม่ทนอุณหภูมิสูง
- 4.2 ทำ plasmid curing และศึกษาสมบัติของ curant ที่ได้ โดยใช้เชื้อ *A. lovaniensis* KU108 หรือ KU112 เป็น model รวมทั้งการคัดเลือก temperature-sensitive mutant ของสายพันธุ์ทั้งสองโดยการทำ mutation
- 4.3 การปรับปรุงสายพันธุ์โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม โดยการนำ curant ของเชื้อ *A. lovaniensis* KU108 หรือ KU112 เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดน้ำส้ม

กิจกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

(1) ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1.1 Saeki A, **Theeragool G**, Matsushita K, Toyama H, Lotong N, Adachi O. Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. Biosc. Biotech. Biochem. 1996 (submitted).

1.2 Saeki A, Taniguchi M, Matsushita K, Toyama H, **Theeragool G**, Lotong N Adachi O. Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation. Biosc. Biotech. Biochem. 1996 (submitted).

(2) ผลงานวิจัยอื่นๆ

2.1 **Theeragool G**, Lotong N, Adachi O, Saeki A Matsushita K. Characterization of thermotolerant acetic acid bacteria isolated in Thailand and IFO (Institute for Fermentation, Osaka) strains. A report submitted to Monbusho International Scientific Research Program : Kasetsart University-Yamaguchi University. 1996: 23 pp.

(3) จำนวนและรายละเอียดการได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร

เป็นวิทยากรเสนอผลงานวิจัยเรื่อง Characterization of thermotolerant acetic acid bacteria isolated in Thailand and IFO strains. ณ มหาวิทยาลัยยามากุชิ ประเทศญี่ปุ่น วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2539

(4) การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆ ทั้งในและต่างประเทศ

4.1 การเชื่อมโยงทางวิชาการกับ Professor Osao-Adachi และ Professor Kazunobu Matsushita ภาควิชาชีวเคมี คณะเกษตร มหาวิทยาลัยยามากุชิ ประเทศญี่ปุ่น และ Mr. Akihiko Saeki ภาควิชาชีวอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีอุตสาหกรรม เมืองยามากุชิ ประเทศญี่ปุ่น ในฐานะนักวิจัยร่วม ภายใต้โครงการ Monbusho International Scientific Joint-Research Program : Kasetsart University-Yamaguchi University และเป็นผู้ดูแลเครือข่ายพันธุ์ของเชื้อกรดน้ำส้มของญี่ปุ่น (IFO strains)

4.2 การเชื่อมโยงทางวิชาการกับ นางวันเชิญ โพธาเจริญ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในฐานะกรรมการสาขาวิชาเอกของนิสิตปริญญาโทที่อยู่ในโครงการนี้ และเป็นที่ปรึกษาในส่วนของการจำแนกสายพันธุ์

(5) การเชื่อมโยงกับนักวิชาการภายในสถาบันเดียวกัน

5.1 การเชื่อมโยงทางวิชาการกับ ศาสตราจารย์นภา โล่ห์ทอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในฐานะที่ปรึกษาและหัวหน้าโครงการวิจัยร่วมระหว่างมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กับมหาวิทยาลัยยามากุชิ รวมทั้งเป็นผู้ดูแลเคราะห้สายพันธุ์ของเชื้อกรดน้ำส้ม (KU102-KU115)

ปัญหาและอุปสรรค

ความเห็นและข้อเสนอแนะ

Executive Summary

สรุปผลงานของปีที่ 1 (1 กันยายน 2538-31 สิงหาคม 2539)

เชื้อกรดน้ำส้ม หรือ acetic acid bacteria เป็นเชื้อที่มีบทบาทในอุตสาหกรรมการผลิตกรดน้ำส้ม เนื่องจากสามารถออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดน้ำส้ม โดยอาศัยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ alcohol dehydrogenase และ aldehyde dehydrogenase นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการผลิตเมือกเซลล์ูลอส จากการศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยาและพันธุศาสตร์ของเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 129 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานของญี่ปุ่น (IFO strains) จำนวน 15 สายพันธุ์ พบว่า มีเชื้อสายพันธุ์ไทยที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 40°C จำนวน 51 ไอโซเลต และสายพันธุ์ญี่ปุ่นที่เจริญได้ที่อุณหภูมิเดียวกัน 8 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีขรุขระ (rough colony, Ro) หรือโคโลนีเรียบที่มีเมือก อันเนื่องมาจากการสร้างสารโพลีแซคคาไรด์ ทำให้ได้ข้อสังเกตว่าเชื้อกรดน้ำส้มที่สร้างสารโพลีแซคคาไรด์จะทนอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่สร้างสารดังกล่าว ส่วนเชื้อที่ทนทั้งอุณหภูมิสูงและความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม 3% ได้ มีจำนวนทั้งสิ้น 11 ไอโซเลต คือ KU 92, KU102, KU105, KU108, KU110, KU112, KU113, KU114, KU115, KU116 และ KU117 ส่วนเชื้อสายพันธุ์ของญี่ปุ่นมีเพียงสายพันธุ์เดียวคือ IFO12467 ที่สามารถทนทั้งอุณหภูมิสูงและความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม 3% ได้ ส่วนการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลความเข้มข้นเริ่มต้น 8% นั้น พบว่าส่วนใหญ่มีเฉพาะสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทยเท่านั้นที่เจริญได้ในสภาวะดังกล่าว จากการคัดเลือกเชื้อโดยอาศัยสมบัติทางสรีรวิทยาดังกล่าวข้างต้นและผลการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกได้จากสับปะรดและองุ่น คือ KU108 (SKU108) และ KU112 (SKU112) ตามลำดับ เป็นสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงและทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม (3%) และเอทานอล (8%) ได้ดีที่สุด ซึ่งจากการจำแนกเชื้อโดยอาศัยสมบัติทางชีวเคมี พบว่า KU108 และ KU112 เป็นสายพันธุ์ *Acetobacter pasteurianus*

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อดังกล่าวข้างต้น โดยการแยกสกัด DNA ทั้งหมดภายในเซลล์ (โครโมโซมและพลาสมิด) แล้ววิเคราะห์ในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ทั้งสายพันธุ์ของไทยและญี่ปุ่น มีพลาสมิดอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพลาสมิดที่มีขนาดเล็ก และพลาสมิดเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมในเชื้อกลุ่มนี้ สาเหตุอีกประการหนึ่งของความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อกลุ่มนี้ คือการมี mobile DNA หรือ insertion sequence จากการศึกษาการกระจายของ insertion sequence, IS1380 ซึ่งเป็นชิ้น DNA ที่แทรกเข้าไปตรงยีน alcohol dehydrogenase (*adh* gene) ในเชื้อกรดน้ำส้ม ปรากฏว่าตรวจพบ IS1380 ในเชื้อกรดน้ำส้มสายพันธุ์ไทยทั้งสิ้น 36 ไอโซเลต (ประมาณ 28% ของเชื้อทั้งหมด) โดยสัญญาณไฮบริดซ์ส่วนใหญ่ที่ตรวจพบทั้งในเชื้อของไทยและญี่ปุ่นจะพบที่โครโมโซมและพลาสมิดขนาดใหญ่ แทบไม่พบสัญญาณไฮบริดซ์กับพลาสมิดขนาดเล็กที่พบว่ามีอยู่มากมายหลายชนิด ซึ่งในจำนวนนี้มีสายพันธุ์ที่พบสัญญาณไฮบริดซ์ที่ชัดเจนจำนวน 17 ไอโซเลต (ประมาณ 13% ของเชื้อทั้งหมด) ส่วนสายพันธุ์ของญี่ปุ่นจำนวน 15 สายพันธุ์ ตรวจพบสัญญาณไฮบริดซ์ที่ชัดเจนใน 6 สายพันธุ์ (ประมาณ 40% ของเชื้อทั้งหมด) โดยการที่ตรวจพบสัญญาณไฮบริดซ์ที่ชัดเจนนี้ แสดงว่าเชื้อดังกล่าวมี IS1380 หรือมี DNA ที่

มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ IS1380 จำนวนหลายชุด (multicopies) โดยสายพันธุ์ที่พบว่ามี IS1380 หลายชุดนั้น แสดงว่ายีน alcohol dehydrogenase ถูก inactivated และมักจะไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลความเข้มข้นสูง (8%) ที่อุณหภูมิ 37°C และไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดความเข้มข้นสูง (3%) ทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 37°C

สรุปผลงานของปีที่ 2 (1 กันยายน 2539-31 สิงหาคม 2540)

จากการที่ตรวจพบพลาสมิดจำนวนมากในเชื้อกรดน้ำส้มส่วนใหญ่ จึงได้ศึกษาบทบาทของพลาสมิดในเชื้อกรดน้ำส้ม *A. pasteurianus* KU108 โดยการทำให้ plasmid curing ด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ acridine orange ความเข้มข้น 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato medium พบว่าสามารถแยก curant ที่แทบไม่มีพลาสมิดเลยได้ทั้งสิ้น 3 โคลน โดย curant ทั้ง 3 โคลนที่แยกได้มีสมบัติต่างๆคล้ายกับ parent strain เช่น การทำให้เกิด overoxidation การเจริญที่อุณหภูมิ 40°C การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลผสมอยู่ 8% ที่อุณหภูมิ 37°C การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดน้ำส้มผสมอยู่ 3% ที่อุณหภูมิ 30°C และลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การสร้างกรดในอาหารเหลวที่มีเอทานอลผสมอยู่ 4% และ 8% ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40°C

การปรับปรุงสายพันธุ์ของ *A. pasteurianus* KU108 โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม เริ่มจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างกรดน้ำส้มที่อุณหภูมิต่างๆ (30, 37 และ 40°C) ของ static และ shaking cultures ซึ่งพบว่าการเจริญและการสร้างกรดน้ำส้มที่อุณหภูมิ 40°C ช้ากว่าที่อุณหภูมิ 37 และ 30°C และโดยเฉลี่ยการสร้างกรดใน static culture เร็วกว่าใน shaking culture เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase และ aldehyde dehydrogenase ที่อยู่ใน membrane fraction พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองที่แยกจาก static culture สูงกว่า shaking culture และการทำ heme staining ของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (subunit II หรือ cytochrome c complex) ก็ให้ผลสอดคล้องกันคือ ในปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน แถบของเอนไซม์ที่แยกจาก static culture มีความเข้มชัดกว่าจาก shaking culture และกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลผสมอยู่จะสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเอทานอลหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดน้ำส้มผสมอยู่ แต่เมื่อทำ heme staining ของเอนไซม์ในสภาวะดังกล่าว ปรากฏว่าความเข้มของแถบโปรตีนใกล้เคียงกันมาก แสดงว่าปริมาณของเอนไซม์ที่ membrane fraction ของเชื้อดังกล่าวใกล้เคียงกัน แต่ต่างกันที่กิจกรรมของเอนไซม์ซึ่งอธิบายได้ว่าในสภาวะที่ไม่มีเอทานอลหรือในสภาวะที่มีกรดน้ำส้ม (low pH) จะพบเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ในรูปของ inactive form ในอัตราส่วนที่สูงกว่าในสภาวะที่มีเอทานอล และจากการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองในเชื้อกรดน้ำส้ม 10 ไอโซเลต พบว่าเอนไซม์ที่แยกจาก *A. pasteurianus* KU108 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ซึ่งจากการศึกษาความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงของเอนไซม์ทั้งสองจาก 10 ไอโซเลตข้างต้น โดยการ treat ที่อุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 40, 50, 60 และ 70°C นาน 10 นาที พบว่าที่ 70°C ตรวจพบเฉพาะกิจกรรม

ของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (3~4% residual activity) จากเอนไซม์ที่แยกจาก *A. pasteurianus* KU108 เท่านั้น ส่วนที่สภาวะเดียวกันสำหรับเอนไซม์ aldehyde dehydrogenase พบกิจกรรมของเอนไซม์ (3~4% residual activity) ใน *A. pasteurianus* KU108, ไอโซเลต KU111, KU112 และ saeki

แผนดำเนินงานตลอดโครงการ 3 ปี

↔ = แผนงานที่เสนอจะทำ

— = แผนงานที่ทำเสร็จแล้ว

การดำเนินงาน	ปีที่ 1		ปีที่ 2		ปีที่ 3	
	เดือนที่ 1-6	เดือนที่ 7-12	เดือนที่ 1-6	เดือนที่ 7-12	เดือนที่ 1-6	เดือนที่ 7-12
1. การศึกษา plasmid profile						
1.1 คัดเลือกและจัดกลุ่มสายพันธุ์ที่มีอยู่เป็นกลุ่มทนและไม่ทนอุณหภูมิสูง	↔					
1.2 แยกสกัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ข้างต้น	↔	↔				
2. การทำ RAPD ของ total DNA						
2.1 ออกแบบและเตรียม DNA primer	↔					
2.2 ทำปฏิกิริยา PCR และวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ทนและไม่ทนอุณหภูมิสูง	↔	↔				
3. การตรวจหา Insertion sequence						
3.1 แยกสกัดดีเอ็นเอและเตรียม DNA probe		↔				
3.2 ทำ Southern hybridization และวิเคราะห์ผล			↔	↔		
4. การทำ plasmid curing						
4.1 เลือกใช้สารที่เหมาะสม			↔			
4.2 วิเคราะห์สมบัติของ curant ที่ได้				↔	↔	
5. การปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม						
5.1 ศึกษาการสร้างกรดที่สภาวะต่างๆของสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง					↔	↔
5.2 ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (<i>adh</i>)					↔	↔
5.3 การโคลนยีน <i>adh</i>					↔	↔

ผลงานวิจัยที่ทำในรอบปี

(1) วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อศึกษาบทบาทของพลาสมิดที่มีอยู่ในเชื้อ *A. pasteurianus* KU108 ว่ามีบทบาทเกี่ยวกับความสามารถในการผลิตกรด การทนอุณหภูมิสูง การทนต่อความเข้มข้นของกรดน้ำส้มและเอทานอลหรือไม่

1.2 เพื่อศึกษาการสร้างกรดในอาหารเหลวของเชื้อ *A. pasteurianus* KU108 ที่อุณหภูมิต่างๆ (30, 37 และ 40°C) ทั้งในสภาวะที่เป็น static และ shaking culture

1.3 เพื่อศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase และ aldehyde dehydrogenase ที่แยกจากเชื้อ *A. pasteurianus* KU108

(2) การดำเนินงานในรอบปีที่ผ่านมา

2.1 การศึกษาบทบาทของพลาสมิดโดยการทำพลาสมิดคิวริง

พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่สามารถจำลองตัวเองได้อย่างอิสระ พบในแบคทีเรียหลายชนิด ความสำคัญของพลาสมิดคือ มีลักษณะทางพันธุกรรมบางลักษณะถูกกำหนดโดยยีนในพลาสมิด เช่น ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความต้านทาน (resistance) สมบัติเมแทบอลิซึม (metabolism) การเกิดโรค (pathogenicity) คอนจูเกชัน (conjugation) และลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการจำลองตัวเอง (Day, 1982 และ Trevors, 1986) พลาสมิดบางชนิดมีความเสถียร และสามารถถ่ายทอดไปสู่เซลล์ใหม่ในระหว่างการแบ่งเซลล์ได้

ในเชื้อกรดน้ำส้ม มีรายงานการศึกษาการกระจาย (distribution) ของพลาสมิด พบว่าเชื้อกรดน้ำส้มส่วนใหญ่ มีพลาสมิดขนาดเล็กจำนวนมาก (Fukaya และคณะ, 1985a; Maricotte และคณะ, 1991) ซึ่งได้มีการนำเอาพลาสมิดขนาดเล็กเหล่านี้มาสร้างเป็นพลาสมิดพาหะ (plasmid vector) เพื่อโคลนยีนเข้าสู่ *Escherichia coli* และ *Acetobacter aceti* No 1023 (Okumura และคณะ, 1985; Fukaya และคณะ, 1985b) รวมทั้งมีรายงานของ Fukaya และคณะ (1985c) พัฒนาวิธีการทำทรานสฟอร์มเมชันเข้าสู่ *A. aceti* No 1023 โดยการเติมสารโพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) หรือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) สำหรับใน *A. pasteurianus* มีรายงานการสร้างพลาสมิดลูกผสมจากพลาสมิด pAC1 ของ *A. pasteurianus* กับ pUC4 ของ *E. coli* (Grones และคณะ, 1989, 1991 และ 1993) ส่วนการถ่ายโอนพลาสมิดเหล่านี้เข้าสู่เซลล์ของเชื้อกรดน้ำส้มมีวิธีการต่างๆ เช่น conjugation (Inoue และคณะ, 1985; Valla และคณะ, 1986) transformation (Fukaya และคณะ, 1985c) และ electroporation (Hall และคณะ, 1992)

การสูญเสียพลาสมิด (plasmid curing) ในแบคทีเรียสามารถทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูง (elevated growth temperature) หรือการใช้สารเคมี เช่น acridine dye, ethidium bromide, mitomycin C ซึ่งตัวอย่างของสารเคมีและกลไกที่ทำให้เกิดพลาสมิดคิวริง ดังแสดงในตารางที่ 1

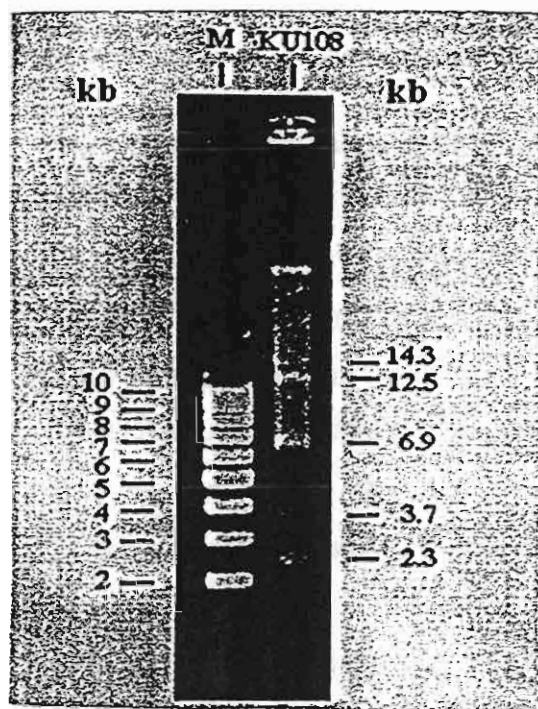
ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารเคมีและกลไกที่ทำให้เกิดพลาสมิดควริง

Curing agent	Mode of action
Acriflavin, acridine orange, ethidium bromide, quinacrine	Intercalating dyes; preferential inhibition of plasmid replication
Coumermycin, novobiocin	Inhibit DNA gyrase-dependent supercoiling of plasmid
Mitomycin C	Metabolic activation followed by nucleophilic attack on purine bases
Rifampicin	Inhibits RNA polymerase
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Plasmid-containing cells are possibly more sensitive to SDS because of plasmid-specified pili on cell surface
Spontaneous plasmid loss	Plasmidless segregants arise during replication or partitioning to daughter cells
Elevated growth temperature	Complete or partial deletions
Thymine starvation	Used only with thymine-requiring auxotroph
Protoplast formation and regeneration	May cause loss of certain plasmids
Incompatibility curing	Plasmid incompatibility in the same cell

ที่มา : Trevores (1986)

การทำพลาสมิดควริงในแบคทีเรียโดยใช้สารเคมี มีรายงานที่ประสบความสำเร็จ เช่น การใช้ SDS (0.002%) ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus* สามารถทำให้พลาสมิดที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ penicillinase สูญเสียไป (Stephen และคณะ, 1972) การใช้ mitomycin C ทำพลาสมิดควริงในเชื้อ *Gluconobacter oxydans* ATCC 9337 ซึ่งทำให้ระบบ glucose oxidation สูญเสียไป (Qazi และคณะ, 1989) การใช้ novobiocin เพื่อทำควริงพลาสมิดใน *Lactobacillus pantarum* (Ruiz-Barba และคณะ, 1991) การใช้ acridine orange ทำให้เกิดการสูญหายของพลาสมิดใน *Bacillus cereus* BIS-59 ซึ่งมีผลให้เชื้อสูญเสียความสามารถในการผลิตสารพิษที่เป็น non-haemolytic (Kamat และ Nair, 1992) และทำให้เกิดการสูญหายของพลาสมิดใน *Pseudomonas* (Pileggi และคณะ, 1994)

ในการศึกษครั้งนี้ จะศึกษาบทบาทของพลาสมิดที่พบใน *A. pasteurianus* KU108 ซึ่งเป็นเชื้อกรดน้ำส้มที่แยกได้จากสับปะรดในประเทศไทย เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดได้ดีที่อุณหภูมิสูง ทนต่อความเข้มข้นของกรดน้ำส้มและเอทานอลได้สูง จากการแยกดีเอ็นเอทั้งหมดของเชื้อนี้มาวิเคราะห์ในอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่ามีพลาสมิดอย่างน้อย 5 ชนิด มีขนาด 2.3, 3.7, 6.9, 12.5 และ 14.3 กิโลเบส ตามลำดับ (ภาพที่ 1) นำเอาเชื้อดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม sodium dodecyl sulfate (0.5-8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ acridine orange (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) คัดเลือกหา curants และวิเคราะห์สมบัติของ curants ที่แยกได้เปรียบเทียบกับ parent strain



ภาพที่ 1 แสดงแถบของพลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อ *A. pasteurianus* KU 108 เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.1.1 การทำพลาสมิดคิวริง

นำเชื้อกรดน้ำส้ม *A. pasteurianus* KU108 มาเลี้ยงในอาหารเหลว potato medium (0.5% glucose, 1.0% yeast extract, 1% polypeptone, 2% glycerol และ 15% potato extract ประมาณ 3.3 กรัม) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายซัสเฟนชั้นของเชื้อ 20 ไมโครลิตรลงในอาหาร 2 มิลลิลิตร ที่ผสม SDS ความเข้มข้น 0.5-8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรบ่มที่ 30°C ด้วยการเขย่านาน 24 ชั่วโมง ใช้ปิเปตดูดซัสเฟนชั้นของเชื้อ 0.1 มิลลิลิตรเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง potato medium ที่ผสมเอทานอล 4% และ bromcresol purple หรือ CaCO_3 (อินดิเคเตอร์แสดงการสร้างกรด) บ่มที่ 30°C นาน 2-5 วัน สุ่มคัดเลือกโคโลนีที่มีขนาดหรือสีโคโลนีต่างๆ มาสกัดแยกพลาสมิดเปรียบเทียบกับ parent strain

นำคิวแรนท์ที่ผ่านการทำพลาสมิดคิวริงครั้งที่ 1 ด้วย SDS ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้พลาสมิดบางแถบหายไปทำพลาสมิดคิวริงต่อโดยเลี้ยงเชื้อในสถานะเดิม และใช้ความเข้มข้นของ SDS 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดซัสเฟนชั้นเชื้อที่ผ่านการ

ทำพลาสติดควริง ครั้งที่ 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนจานอาหาร สุ่มคัดเลือก คิวแรนท์มาสกัดแยกพลาสติด และเนื่องจากคิวแรนท์ที่สุ่มคัดเลือกมาส่วนใหญ่ยังมีแถบพลาสติดอยู่ จึง นำคิวแรนท์ที่มีแถบของพลาสติดเหลือน้อยที่สุดมาทำควริงต่อโดยใช้ acridine orange ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการถ่ายยาสเฟนชั้นของเชื้อลงในอาหารใหม่ทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 10 ครั้ง ใช้ปิเปตดูดยาสเฟนชั้นของเชื้อที่ผ่านการทำพลาสติดควริงครั้งที่ 10 มาทำ dilution และใช้ยาสเฟนชั้นของ เชื้อ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหารแข็ง สุ่มคัดเลือกคิวแรนท์มาสกัดแยกพลาสติด

2.1.2 การตรวจสอบสมบัติของคิวแรนท์

นำคิวแรนท์ที่ได้จากการทำ พลาสติดควริงด้วย SDS ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ acridine orange ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบสมบัติต่างๆ เปรียบเทียบกับ parent strain ดังนี้

1. ทดสอบสมบัติการทนอุณหภูมิสูง (40°C) โดยดูจากการเจริญบนอาหารแข็ง potato medium บ่มที่ 40°C นาน 2-5 วัน

2. ทดสอบสมบัติการทนต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้มและเอทานอลที่อุณหภูมิ 30 และ 37°C โดยดูการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง potato medium ที่ผสมกรดน้ำส้ม 1-5% หรือ เอทานอล 1-10% บ่มที่ 30 หรือ 37°C นาน 2-5 วัน

3. ตรวจสอบขนาดเซลล์ของคิวแรนท์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยใช้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร เหลว potato medium ที่ 30°C นาน 18-24 ชั่วโมง

4. ทดสอบการสร้างกรดน้ำส้มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40°C โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว seed culture medium (0.5% glucose, 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone และ 0.5% glycerol) ที่ผสม เอทานอล 4 และ 8% โดยถ่ายเชื้อที่เลี้ยงใน potato medium ที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน seed culture medium ปริมาตร 90 มิลลิลิตรในฟลasks ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มใน สภาวะที่ไม่เขย่า (static culture) เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างเชื้อทุกวันๆ ละประมาณ 2.5 มิลลิลิตร เพื่อนำมาวัดดูความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และ วิเคราะห์ปริมาณกรดโดยนำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

2.2 การศึกษาการสร้างกรดในอาหารเหลวของเชื้อ *A. pasteurianus* KU108

การผลิตกรดน้ำส้มในระดับอุตสาหกรรม อาศัยปฏิกิริยาการออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดน้ำ ส้ม ซึ่งจะมีการปล่อยพลังงานหรือความร้อนออกมา ทำให้อุณหภูมิระหว่างการหมักสูงขึ้น โดยธรรมชาติ แล้ว เชื้อกรดน้ำส้มเป็นเชื้อที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง $25-30^{\circ}\text{C}$ ดังนั้นถ้าอุณหภูมิระหว่างการหมักสูงขึ้น จะทำให้อัตราเร็วของการหมักและประสิทธิภาพการสร้างกรด น้ำส้มลดลง ทำให้มีความจำเป็นต้องคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง ทนต่อความเข้มข้นของเอทานอล และกรดน้ำส้มสูง (Ohmori และคณะ, 1980; Saeki และคณะ, 1997) หรือพัฒนากระบวนการหมัก Lotong และคณะ, 1989) ให้เหมาะสมขึ้น

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาการสร้างกรดของเชื้อ *A. pasteurianus* KU108 ในอาหารเหลว seed culture ที่ผสมเอทานอล 4 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์มีแขน (side-arm flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร นำมาบ่มแบบไม่เขย่า (static culture) และเขย่า (shaking culture) ที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาค่าต่างๆดังนี้

1. วัดความขุ่นของเซลล์ โดยเครื่อง Klett Sumerson

2. วัด pH

3. ไตเตรตหาปริมาณกรดโดยใช้ NaOH ความเข้มข้น 0.08 N และใช้ phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์ โดยใช้ micropipette ดูดน้ำเลี้ยงเชื้อมา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดแก้ว เติมน้ำกลั่นลงไป 900 ไมโครลิตร (ทำให้ตัวอย่างเจือจาง 10 เท่า) ใส่ phenolphthalein ลงไป 5 ไมโครลิตร (0.01 กรัมใน 25 มิลลิลิตร ของ 70% เอทานอล) นำมาไตเตรตกับ NaOH ความเข้มข้น 0.08 N วัดปริมาณ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรต แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณกรด

4. หาปริมาณเอทานอลโดยวิธี ferricyanide reductase activity (dupanol method) ด้วยการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ alcohol dehydrogenase โดยนำเอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์จาก *A. acetii* (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Dr. Kazunobu Matsushita มหาวิทยาลัยซามาคุชิ ประเทศญี่ปุ่น) มาเจือจางประมาณ 200-400 เท่าด้วย 50 mM potassium phosphate buffer (KPB) pH 6.5

การเตรียม 10 mM เอทานอล ใช้เอทานอล 2.3 กรัมผสมกับน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 50 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 4 M เวลาจะใช้นำมา 1 มิลลิลิตร เจือจางให้เป็น 100 มิลลิลิตร

การทำปฏิกิริยาเพื่อทำ standard curve หาปริมาณเอทานอล

Reaction mixture	ปริมาตร (ไมโครลิตร)					
	0	5	10	15	20	25
1. 10 mM Ethanol	0	5	10	15	20	25
2. distilled water	100	95	90	85	80	75
3. ADH solution	100	100	100	100	100	100
4. 10 mM KAB pH6.0	600	600	600	600	600	600

นำ reaction mixtures ข้างต้นมาบ่มที่ 25°C 5 นาที เติม potassium ferricyanide ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ลงไป 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 25°C นาน 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม dupanol ลงไป 500 ไมโครลิตร บ่มต่อที่ 25°C นาน 20 นาที เติมน้ำกลั่นลงไป 3.5 มิลลิลิตร นำมาวัด O.D ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในน้ำเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีปริมาณเอทานอลประมาณ 4 % จะต้องเจือจางตัวอย่างประมาณ 3,000 เท่า (1,000-2,000 เท่า สำหรับปริมาณเอทานอล 2 %) นำเอาตัวอย่างที่เจือจางแล้วมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ADH แล้ววัดค่า O.D₆₆₀ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณของเอทานอล

2.3 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase และ aldehyde dehydrogenase ที่แยกจากเชื้อ *A. pasteurianus* KU108

การออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดน้ำส้ม อาศัยปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก เป็นปฏิกิริยาออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นอัลดีไฮด์ โดยเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol Dehydrogenase, ADH) ขั้นตอนที่สองเป็นปฏิกิริยาออกซิไดซ์อัลดีไฮด์ที่ได้ ให้เป็นกรดน้ำส้ม โดยเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Aldehyde Dehydrogenase, ALDH) เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้อยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound enzymes) (Adachi และคณะ, 1978a และ 1978b; Ameyama และ Adachi, 1982a และ 1982b) มีรายงานว่า เอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงมากกว่าเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Adachi และคณะ, 1988) โดยทั่วไปเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากเชื้อกรดน้ำส้มประกอบด้วย subunit ย่อย 3 subunits คือ subunit I, II และ III (Matsushita และคณะ, 1987, 1992a, 1992b, 1992c และ 1994; Takemura และคณะ, 1993) ยกเว้นเอนไซม์จาก *A. polyoxogenase* ซึ่งประกอบด้วย subunit ย่อยเพียง 2 subunits คือ subunit I และ II (Tayama และคณะ, 1989) มีรายงานการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *adh* จาก *A. pasteurianus* subunits I และ II (Takemura และคณะ, 1993) และ subunit III (Kondo และคณะ, 1995) และ *A. polyoxogenase* subunits I และ II (Tayama และคณะ, 1989) หน้าทีของแต่ละ subunit คือ subunit I เป็น dehydrogenase subunit มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72-80 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย pyrroloquinoline, PQQ และ cytochrome c 1 mole (Matsushita และคณะ, 1996) และสามารถเปลี่ยนจาก active เป็น inactive form ได้ (Matsushita และคณะ, 1995) subunit II เป็น cytochrome c subunit (ประกอบด้วย cytochrome c 3 mole) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 44-54 กิโลดาลตัน และ subunit III ซึ่งอาจมีบทบาทในการรักษาความเสถียรของการจับกันระหว่าง subunit I กับ subunit II (Kondo และคณะ, 1995)

ในการทดลองนี้ได้แยกเอนไซม์ ADH และ ALDH จากเยื่อหุ้มเซลล์ของ *A. pasteurianus* KU108 แล้วนำมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่สภาวะของการเลี้ยงเชื้อต่างๆ กัน และวิเคราะห์ปริมาณของ subunit II (cytochrome C) โดยวิธี heme staining ซึ่งแต่ละการทดลองมีวิธีการทำดังนี้

2.3.1 การแยกเอนไซม์ ADH และ ALDH จากเยื่อหุ้มเซลล์ของ *A. pasteurianus* KU108

นำเอาเซลล์ที่เลี้ยงที่สภาวะต่างๆ มาปั่นเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง ด้วย 50 mM potassium phosphate buffer (KPB) pH 6.0 ทำซัสเพนชันของตะกอนเซลล์ที่ล้างแล้วด้วย 50 mM KPB pH 6.0 โดยใช้ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อเซลล์ 1 กรัม (น้ำหนักเปียก หรือ wet weight) นำซัสเพนชันของเชื้อมาผ่าน French pressure cell press ที่ความดัน 16,000 psi 2 ครั้ง นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ปกติออกไป นำเอา supernatant มาแยก membrane fraction ออกจาก soluble fraction โดยการปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ความเร็วรอบ 40,000 รอบต่อนาที นาน 90 นาที ตูดน้ำใส (soluble fraction) ออกจากหลอดให้หมด ละลายตะกอน (membrane fraction) ใน 50 mM KPB pH 6.0 โดยใช้ homogenizer จนได้สารละลายเนื้อเดียวกัน

2.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

ใช้วิธี ferricyanide reductase activity หรือ Dupanol method โดยกิจกรรมของเอนไซม์ ADH และ ALDH จะวิเคราะห์จากความสามารถในการรีดิวซ์ potassium ferricyanide ควบคู่กับ dehydrogenation ของซบสเตอร์ โดย reaction mixture ประกอบด้วย

0.1 มิลลิลิตร enzyme solution

0.6 มิลลิลิตร McIlvaine buffer pH 5.0 (mixture of 75 mM Na_2HPO_4 และ 38 mM citrate)

0.1 มิลลิลิตร 1 M substrate (ethanol for ADH, acetaldehyde for ALDH)

บ่มที่ 25°C นาน 5 นาที เติม 0.2 มิลลิลิตรของ 0.1 M potassium ferricyanide บ่มต่อที่ 25°C 5 นาทีหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 มิลลิลิตรของ ferric sulfate-Dupanol reagent (0.3% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 8.7% phosphoric acid และ 0.3% SDS) ทั้งไว้ที่ 25°C นาน 20 นาที เติม 3.5 มิลลิลิตรของน้ำกลั่น นำไปวัด O.D.₆₆₀

One unit of the enzyme activity was expressed as 1 μmol of substrate oxidized per minute, which is equivalent to 4.0 absorbance units.

2.3.3 การหาความเข้มข้นของโปรตีน

ใช้วิธีของ Lowery โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็น standard โดยการนำตัวอย่างมา 0.4 มิลลิลิตร เติม 0.2 มิลลิลิตรของสารละลายผสม solution A : solution B = 50:1 (solution A = 2% Na_2CO_3 in 0.1 N NaOH containing 0.5% SDS, solution B = 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 1% potassium sodium tartate) บ่มที่ 35°C นาน 10 นาที เติม 0.2 มิลลิลิตรของ solution C (phenol reagent) ผสมให้เข้ากันอย่างเร็ว บ่มที่ 35°C นาน 30 นาที นำไปวัด O.D.₇₅₀

2.3.4 การทำ heme staining ของ ADH protein ใน membrane fraction

มีขั้นตอนการดำเนินงานนี้ นำเอา membrane fraction ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมมาผสมกับ sample buffer และต้มที่ 60°C 30 นาที หยอดตัวอย่างลงในหลุมของ 12.5% SDS-PAGE ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้า 5 มิลลิแอมป์ ในช่วงของ stacking gel และ 10 มิลลิแอมป์ ในช่วงของ separating gel ใช้ protein size marker ของบริษัท Biorad ซึ่งประกอบด้วย phosphorylase B (101,000 ดาลตัน) bovine serum albumin (83,000 ดาลตัน) ovalbumin (50,600 ดาลตัน) carbonic anhydrase (35,500) soybean trypsin inhibitor (29,100 ดาลตัน) และ lysozyme (20,900 ดาลตัน) นำเจลมาย้อมใน staining buffer (6 มิลลิลิตร ของ 9 มิลลิกรัม 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine, TMBZ ในเมทานอล และ 14 มิลลิลิตร ของ 0.25 M acetate buffer pH 5.0) โดยการเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1-2 ชั่วโมง เติม 60 ไมโครลิตรของ hydrogen peroxide ลงใน staining buffer ทั้งไว้ 30 นาที จะเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงิน หยุดปฏิกิริยาโดยการเท staining bufferทิ้ง แล้วแช่เจลไว้ในสารผสมของ 3 มิลลิลิตร isopropanol และ 7 มิลลิลิตร ของ 0.25 M acetate buffer pH 5.0

2.3.5 ความเสถียรของเอนไซม์ ADH และ ALDH ที่อุณหภูมิสูง

นำ membrane fraction ของเชื้อกรดน้ำส้ม 10 ไอโซเลต คือ KU8, KU58, KU61, KU84, KU102, KU108, KU111, KU112, IFO3284 และ saeki มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ADH และ

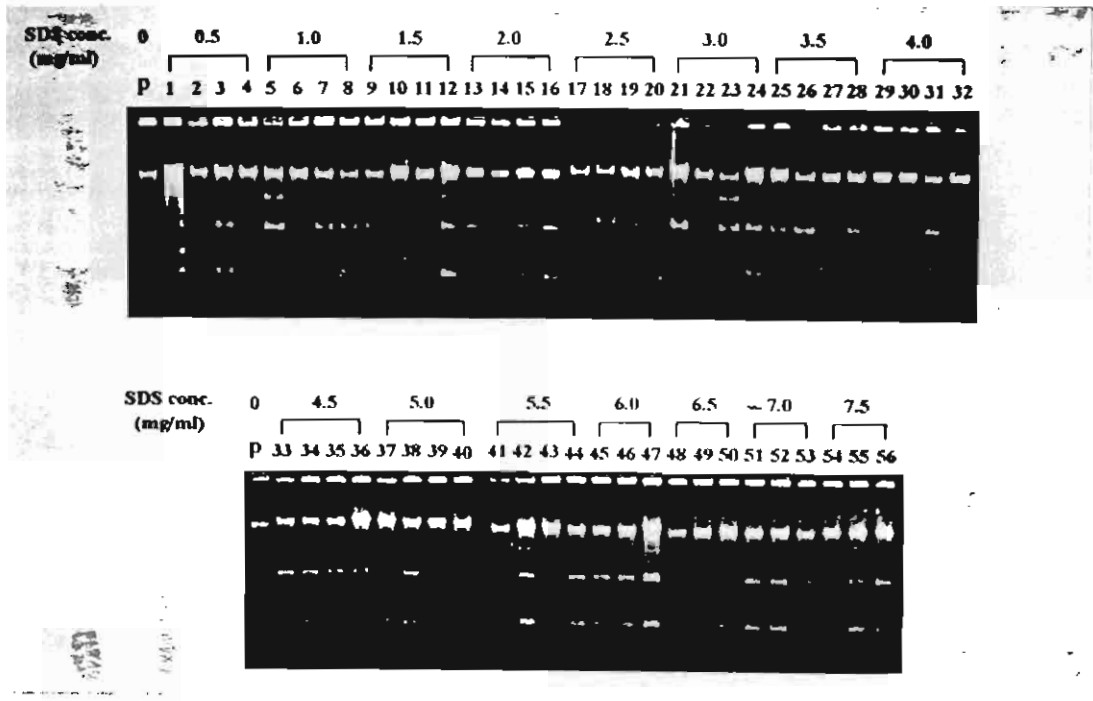
ALDH จากนั้นนำมาศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูง โดยการนำเอา membrane fraction มา treat ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 และ 70°C นาน 10 นาที แล้ววิเคราะห์หา residual activity

(3) ผลที่ได้รับ

3.1 คิวแรนท์ที่ได้จากการทำพลาสมิดคิวริงและสมบัติของคิวแรนท์

จากการนำเชื้อกรดน้ำส้ม *A. pasteurianus* KU108 มาทำพลาสมิดคิวริงโดยใช้ SDS ความเข้มข้น 0.5-8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นของ SDS เท่ากับ 0.5-5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเชื้อที่สามารถเจริญได้ความเข้มข้นจะประมาณ 200-300 โคโลนี และที่ความเข้มข้น 5.5-7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเชื้อที่สามารถเจริญได้ความเข้มข้นจะประมาณ 100-150 โคโลนี ซึ่งทุกโคโลนีสามารถสร้างกรดโดยเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ส่วนที่ความเข้มข้นของ SDS เท่ากับ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบเชื้อที่เจริญได้อาจเนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวสูงเกินไป สุ่มคัดเลือกโคโลนีของคิวแรนท์มาความเข้มข้นละ 30-40 โคโลนี เพื่อแยกสกัดพลาสมิดและวิเคราะห์ในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส เปรียบเทียบกับ parent strain ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งพบว่าการใช้ SDS ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญหายของพลาสมิดของเชื้อ *A. pasteurianus* KU 108 ได้อย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าพลาสมิดของเชื้อนี้มีความเสถียรสูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sievers และ Teuber (1995) ที่ได้ศึกษา plasmid profile ของเชื้อน้ำส้มสายชูที่แยกได้จากกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูในประเทศเยอรมันและสวิตเซอร์แลนด์โดยถ่ายเชื้อทุกสัปดาห์ลงในอาหารใหม่เป็นเวลา 18 เดือน และทุก 3 เดือน สกัดแยกพลาสมิด พบว่าทุกสายพันธุ์มีพลาสมิดที่เสถียร ดังนั้นจึงทำพลาสมิดคิวริงต่อโดยเปลี่ยนมาใช้ acridine orange (AO) โดยนำคิวแรนท์หมายเลข 60 ที่ผ่านการทำพลาสมิดคิวริงครั้งที่ 6 ซึ่งมีแถบของพลาสมิดเหลือน้อยที่สุดมาเลี้ยงในอาหารเหลว potato medium บ่มโดยการเขย่าด้วยความเร็วรอบและอุณหภูมิเท่าเดิมนาน 24 ชั่วโมง ถ่ายซัสเพนชันเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดอาหาร potato medium ที่ผสม acridine orange เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็วรอบและอุณหภูมิเท่าเดิมจนครบ 10 ครั้ง จากนั้นนำซัสเพนชันเชื้อที่ผ่านการทำพลาสมิดคิวริงครั้งที่ 10 มาเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม (30-300 โคโลนี) เนื่องจากเชื้อเจริญได้ดีสังเกตจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีความขุ่นมาก นำซัสเพนชันเชื้อที่เจือจางมา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารแข็ง potato medium ที่ผสม bromcresol purple และเอทานอล 4 % บ่มที่อุณหภูมิและเวลาเท่าเดิม พบว่าที่ความเจือจาง $1/10^6$ มีโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 52 โคโลนี และทุกโคโลนีสามารถสร้างกรดโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง จึงสุ่มคัดเลือกมา 20 โคโลนี เพื่อสกัดแยกพลาสมิดเปรียบเทียบกับเชื้อ *A. pasteurianus* KU 108 (P) ที่ไม่ได้ผ่านการทำพลาสมิดคิวริง ดังแสดงผลในภาพที่ 3 พบว่าคิวแรนท์หมายเลข 85,86 และ 87 เกิดการสูญหายของพลาสมิดเกือบสมบูรณ์ ซึ่งจากการทำพลาสมิดคิวริงโดยใช้ SDS กับเชื้อ *A. pasteurianus* KU 108 พบว่าพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่า 2.3 กิโลเบส ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญหายของพลาสมิดได้สูงกว่าพลาสมิดที่มีขนาดเล็ก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ruiz-Barba และคณะ (1991) ที่ศึกษาพลาสมิดคิวริงในเชื้อ *Lactobacillus plantarum* โดยใช้สาร novobiocin

เหนียวทำให้เกิดการสูญหายของพลาสมิดพบว่าทุกสายพันธุ์เกิดการสูญหายของพลาสมิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขณะที่พลาสมิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเกิดการสูญหายของพลาสมิดด้วยความถี่ที่ต่ำกว่า ดังนั้นการใช้ SDS ร่วมกับ acridine orange จะมีประสิทธิภาพในการเหนียวทำให้เกิดการสูญหายของพลาสมิดขนาดเล็กของเชื้อ *A. pasteurianus* KU 108 ได้ดีกว่าการใช้ SDS เพียงชนิดเดียว



ภาพที่ 2 แสดงแถบพลาสมิดของคิวแรนท์ของ *A. pasteurianus* KU 108 ที่ผ่านการทำพลาสมิดคิวรีง โดยใช้ SDS ความเข้มข้น 0.5-7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ parent strain (p)