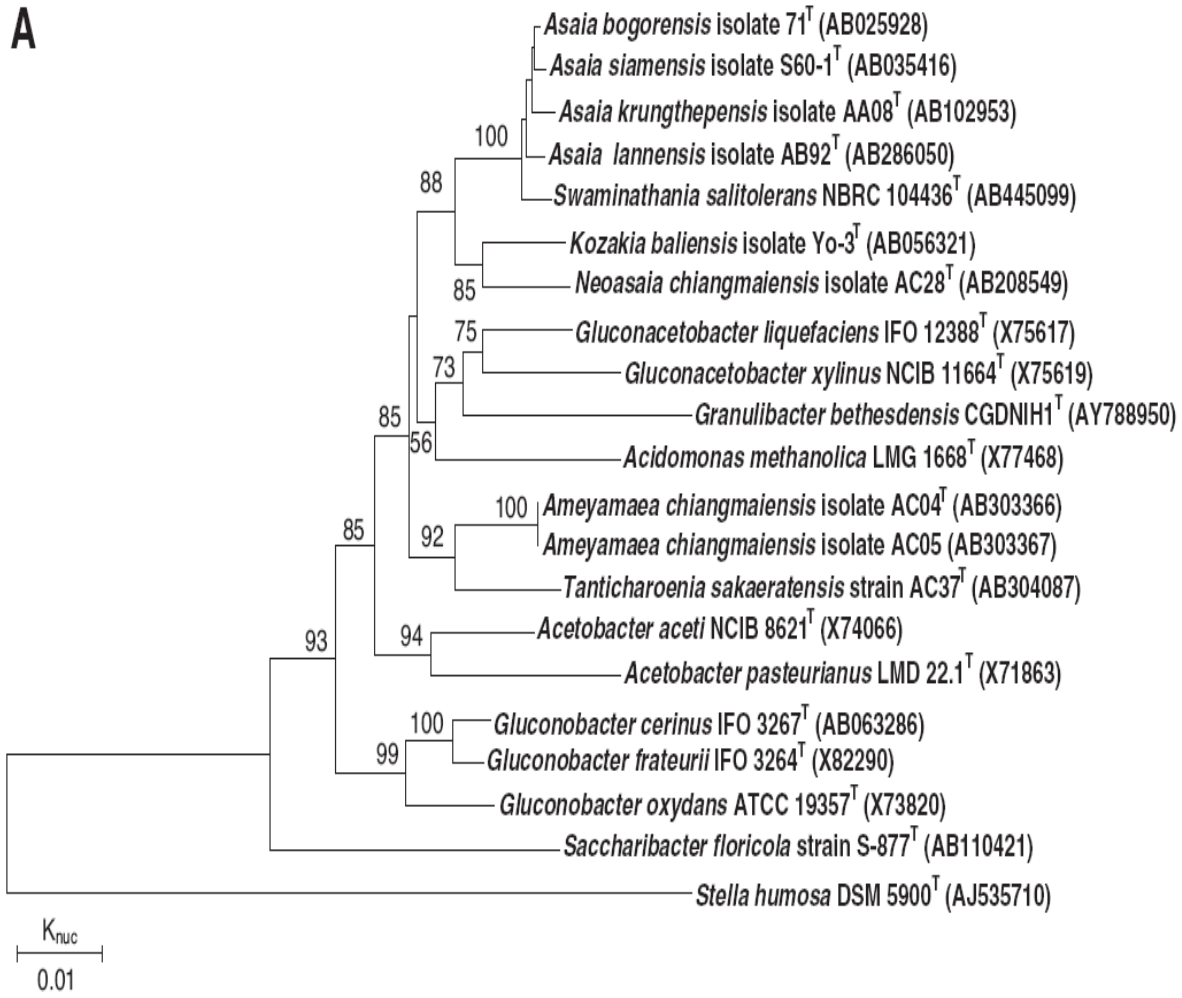
บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

แบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูจัดอยู่ใน Family Acetobacteraceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบหรือบางครั้งอาจเปลี่ยนแปลงการติดสีแกรมได้ (Gram variable) เซลล์มีรูปร่างตั้งแต่กลมรีจนถึงท่อนอาจเป็นท่อนตรงหรือโค้ง เซลล์อาจอยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสาย และอาจพบได้ในลักษณะกลม(spherical) ยืดยาว(elongated) บวม(swollen) รูปร่างเป็นกระบอง(club shape) หรือเป็นเส้นสาย(filament) เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลารอบเซลล์ หรือแฟลกเจลลาที่ขั้ว หรือไม่เคลื่อนที่ ไม่พบการสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ต้องการอากาศหายใจอย่างยิ่ง (strictly aerobic) โดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย(terminal electron acceptor) ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (chemoorganotroph) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 5-6 ไม่ย่อยสลาย เจลลาติน ไม่พบการรีดิวซ์ไนเตรท ไม่สร้างอินโดล (indole negative) สามารถออกซิไดซ์ เอทานอลให้เป็นกรดอะซิติกได้ที่สภาวะเป็นกลางและเป็นกรด ส่วนใหญ่เจริญในอาหารที่มีน้ำตาล ดี-กลูโคส (D-glucose) หรือ ดี-ไซโลส (D-xylose) สามารถพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีน้ำตาลและแอลกอฮอล์ เช่นในดอกไม้ ผลไม้ เบียร์ ไวน์ อาหารหมักดอง น้ำแอปเปิลหมัก น้ำส้มสายชูหมัก และน้ำผึ้ง

แบคทีเรียกรดน้ำส้มถูกจัดไว้ใน α - Proteobacteria, family *Acetobacteraceae* ซึ่งมีทั้งหมด 12 สกุลดังนี้ *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia* และ *Ameyamaea* (Sengun and Karabiyikli.,2011)โดยการจัดจำแนกดังกล่าวอาศัยพื้นฐานการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ตามลำดับวิวัฒนาการบริเวณ 16S rDNA (ดังรูป ที่ 2.1.) (Sievers *et al.,* 1994 ; Yamada *et al.,* 2000) รวมไปถึงลักษณะทางฟีโนไทด์ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู และความเหมือนกันของสารพันธุกรรมเป็นสำคัญ



ภาพที่ 2.1 **แสดงลักษณะความสัมพันธ์ทางสายการวิวัฒนาการของแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู ใน** Family Acetobacteraceae **โดยอาศัยพื้นฐานการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ตามลำดับวิวัฒนาการบริเวณ** 16S rDNA

ที่มา: Yukphan *et al*., 2009

Family Acetobacteraceae และสกุลต่างๆ

ในปี 1898 Beijerinck ได้พบสกุล *Acetobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ต้องการอากาศในการดำรงชีวิต และสามารถผลิตกรดอะซิติกจากเอทานอลและได้ตั้ง *Acetobacter aceti* เป็นสายพันธุ์แรกในสกุลนี้

ในปี 1935 Asai เสนอสกุลที่ 2 ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูและให้ชื่อว่า *Gluconobacter* ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากสกุล *Acetobacter* โดยที่สายพันธุ์ของสกุล *Acetobacter* สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นอะซิติกได้อย่างรวดเร็ว (Beijerinck, 1989) ในขณะที่สายพันธุ์ของสกุล *Gluconobacter* สามารถออกซิไดซ์กลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิกได้อย่างรวดเร็วกว่าสกุลของ *Acetobacter*

ในปี 1942 Vaughn จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูตามการออกซิไดซ์อะซิเตทและแลคเตทเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่สามารถออกซิไดซ์อะซิเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำและกลุ่มที่ไม่สามารถออกซิไดซ์อะซิเตท อย่างไรก็ตาม การจำแนกโดยวิธีนี้ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียดังกล่าวในระดับสกุลได้

ในปี 1954 Leifson พบว่าการทดสอบการออกซิไดซ์อะซิเตทและแลคเตทและชนิดของแฟลกเจลลา สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูเป็น 2 สกุล คือกลุ่มที่มีแฟลก เจลลารอบเซลล์ (peritrichous flagella) และสามารถออกซิไดซ์อะซิเตท และแลกเตทได้คือ *Acetobacter* และกลุ่มที่มีแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ (polar flagella) และไม่สามารถออกซิไดซ์อะซิเตท และแลกเตทซึ่งเป็นสกุลใหม่ เรียกว่า “*Acidomonas*” ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับสกุล *Gluconobacter* ที่เสนอโดย Asai ในปี 1935

ในปี 1961 De Ley กล่าวว่า *Gluconobacter oxydans* พบก่อน *Acidomonas oxydans* จึงจัด *Acidomonas oxydans* เป็น *Gluconobacter oxydans*

ในปี 1964 Asai และคณะ พบว่า 2 สกุลของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูเป็นสายพันธุ์ ที่มี polar flagellated intermediate ซึ่งไม่สามารถออกซิไดซ์อะซิเตท แต่สามารถออกซิไดซ์ แลคเตทได้

ในปี 1968 Yamada และคณะ ได้ศึกษาการกระจายของสารประกอบยูบิควิโนน พบว่าสายพันธุ์ที่มี polar flagellated intermediate จะมี Q-8 เป็นยูบิควิโนนหลัก นอกจากนี้ยังพบว่า สกุล *Acetobacter* และสกุล *Gluconobacter* มี Q-9 และ Q-10 เป็นยูบิควิโนนหลักตามลำดับ

ในปี 1980 Swings และคณะ ได้เสนอว่าสายพันธุ์ที่มี polar flagellated intermediate เป็นสกุล *Frateuria* ซึ่งเป็นสกุลใหม่ใกล้เคียงกับ *Pseudomonas* และ *Xanthomonas* โดยอาศัยพื้นฐานของ DNA : rRNA : hybridization

ในปี 1983 Yamada และคณะ ได้เสนอ subgenus *Acetobacter* และ *Gluconacetobacter* ในสกุล *Acetobacter* โดยใช้พื้นฐานการกระจายของสารประกอบยูบิควโนน

ในปี 1983 Gossele และคณะ กับ De Lay (1984) และคณะ ได้ตั้งอะซิติกแอซิดแบคทีเรียขึ้น 2 สกุล คือ *Acetobacter* และ *Gluconacetobacter* ในFamily Acetobacteraceae

ในปี 1989 Urakami และคณะ ได้ตั้งสกุลที่ 3 ขึ้นใน family *Acetobacteraceae* เรียกว่า *Acidomonas* ซึ่งสกุลนี้จะมีลักษณะเฉพาะดังนี้ คือ ชอบกรด เจริญได้ในที่ที่มีอากาศเล็กน้อยและเป็นแบคทีเรียที่ผลิตน้ำสมสายชูที่สามารถเจริญได้ในเมทานอล ผลการศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจาก Bulygina *et al.*,(1992)โดยพื้นฐานการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ 5S rRNA และการศึกษาของ Yamada *et al*., (1997) โดยใช้พื้นฐานการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA และยูบิควิโนน

ในปี 2000 Yamada และคณะ เสนอสกุลที่ 5 ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู ซึ่งมีชื่อว่า *Asaia* ซึ่งคัดแยกได้จากดอกชงโค (*Bauhinia purpurea,* Linn.) ดอกพยับหมอก (*Plumbago auriculata*, Lam. Lead Wort.) และน้ำข้าวเหนียวหมัก จากประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งแบคทีเรียสกุลนี้ สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงที่มีความเข้มข้น ของน้ำตาลกลูโคสสูงถึง 30%

ในปี 2002 Lisdiyanti และคณะ เสนอสกุลที่ 6 ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู ซึ่งมีชื่อว่า *Kozakia* ซึ่งแยกได้จากน้ำตาลปาล์มสีน้ำตาลและธัญพืชในบาหลี ประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งแบคทีเรียสกุลนี้มีลักษณะพิเศษคือ สามารถผลิต levan-like polysaccharide จากน้ำตาลซูโครสได้

ในปี 2002 Treck และ Teuber รายงานการจัดจำแนกแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูด้วยวิธีการ การวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ บริเวณ16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions (16S-23S rDNA ITS –RFLP) ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Hae*III และ *Hpa*II ซึ่งพบว่าวิธีการดังกล่าวให้ผลตรงกับการจัดจำแนกเดิมเพียง 1 ใน 12 กลุ่มเท่านั้น

ในปี 2003 Lisdiyanti และคณะ รายงานการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดน้ำส้มสายชูใน ประเทศ อินโดนีเซีย ประเทศไทย และประเทศฟิลิปปินส์ และพบว่า สกุล *Acetobacter* พบในอาหารหมักดองและผลไม้, สกุล *Gluconobacter* พบได้ทั้งในอาหารหมักดอง ผลไม้ ดอกไม้ และอื่นๆ, สามารถพบสกุล *Asaia* จากดอกไม้ และสามารถพบสกุล *Kozakia* ได้ใน ธัญพืชบางชนิดและในน้ำตาลปาล์มสีน้ำตาล

ในปี 2004 Yukphan และคณะ รายงานการศึกษาการจัดจำแนกสกุล *Gluconobacter* ได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ (16S-23S rDNA ITS sequencing) และการวิเคราะห์ 16S-23S rDNA ITS –RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Mbo*II และ *Bsp*1286I ซึ่งจากการศึกษาด้วยวิธีนี้พบว่า สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Gluconobacter* ในระดับสายพันธุ์ได้

ในปี 2004 Loganathan และ Nair เสนอสกุลที่ 7 ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูซึ่งมีชื่อว่า *Swaminathania* ซึ่งแยกได้จากบริเวณดินรอบราก ราก และลำต้นข้าวพันธุ์พื้นเมือง (*Porteresia coarctata* Tateoka) บริเวณป่าชายเลนในประเทศอินเดีย แบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้มีลักษณะพิเศษคือ สามารถเจริญในสภาวะที่มี 3% เกลือ (NaCl) และ 1 % KNO_3 ได้

ในปี 2004 Jogima และคณะ เสนอสกุลที่ 8 ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูซึ่งแยกได้จากเกสรดอกไม้ในประเทศญี่ปุ่น และตั้งชื่อว่า *Saccharibacter floricola* แบคทีเรียสายพันธุ์นี้จัดเป็น osmophilic acetic acid bacteria เนื่องจากเจริญได้เฉพาะในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส เข้มข้นร้อยละ 20-30

ในปี 2005 Yukphan และคณะ เสนอสกุลที่ 9 ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูและตั้งเป็นสกุล *Neoasaia* ซึ่งแยกได้จากดอกขิงแดง (*Alpinia purpurata,* (vieill.) K. Schum.) ในจังหวัดเชียงใหม่, ประเทศไทย

ในปี 2005 Trcek ได้รายงานถึงวิธีการจัดจำแนกแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ pyroloquinoline quinone (PQQ)-dependent alcohol dehydrogenase (ADH) gene และยืนยันผลการแสดงออกของยีนบริเวณดังกล่าว เพื่อเสนอว่าสามารถใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียได้ เนื่องจากมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved regions) และบริเวณแปรผัน (variation regions) อยู่ซึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ 16S rDNA แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังมีข้อมูลไม่เพียงพอในการจัดจำแนกเพียงลำพังได้และยังมีข้อจำกัดอยู่ในบางสกุล เช่น *Asaia* เพราะกระบวนการแสดงออกของยีนถูกยับยั้งหรือ ADH ไม่เกิดกิจกรรม อย่างไรก็

ดี Trcek ยังเสนอแนะว่าวิธีนี้สามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวเป็นเป้าหมายในการวิเคราะห์ PCR-specific primer product โดยเสนอให้ใช้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Acetobacter aceti* เป็นต้นแบบของ specific primer เพื่อตรวจหา PCR product ได้โดยตรง สำหรับตรวจหาแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูในอุตสาหกรรมผลิตน้ำส้มสายชูหรืออื่นๆ ได้ ซึ่งเป็นวิธีการทางชีวโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

ในปี 2006 Yukphan และคณะได้รายงานการจัดจำแนกสกุล *Asaia* ด้วยวิธีการ16S-23S rDNA ITS –RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Taq*I และ *Mva*I และพบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถใช้ในการจัดจำแนกได้ในระดับสายพันธุ์ได้เพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังสามารถใช้เป็นข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลประกอบกับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อจัดจำแนก *Asaia* ในระดับสายพันธุ์ได้ ในปีเดียวกันนี้ Yukphan และคณะได้รายงานและเสนอการจัดจำแนก *Asaia* ในระดับสายพันธุ์ด้วยวิธีการวิเคราะห์ 16S rDNA-RFLP โดยใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Sty*I, *Bsa*JI และ *Sna*BI พร้อมกับใช้16S-23S rDNA ITS –RFLP ร่วมวิเคราะห์อีกด้วย

Greenberg และคณะ (2006) เสนอสกุลที่ 10 ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูซึ่งมีชื่อว่า *Granulibacter* โดยคัดแยกได้จากผู้ป่วย chronic granulomatous ในประเทศสหรัฐอเมริกา

ในปี 2007 Malimas และคณะได้เสนอสปีชีส์ใหม่ในจีนัส Gluconobacter คือ *Glucobacter kondonii* เพิ่มขึ้นจากที่มีอยู่เดิม 3 สปีชีส์ได้แก่ *G.oxydans* , *G.cerinus*, *G.frateurii* โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสบน16s-23s rDNA บริเวณ ITS(DNA sequencing) และทำการทดสอบหาความแตกต่างของสารพันธุกรรมด้วยวิธี DNA-DNA hybridization โดยใช้วิธี photobiotin labeling method

ในปี 2008 Malimas และคณะได้เสนอสปีชีส์ใหม่ในจีนัส Gluconobacter เพิ่มขึ้นอีก 2สปีชีส์คือ *Glucobacter roseus* และ *Glucobacter sphaericus* โดยระบุความแตกต่างของแต่ละสปีชีส์โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสบน16s-23s rDNA บริเวณ ITS(DNA sequencing) ,การจัดจำแนกโดยใช้วิธีการวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอบนแผ่นอะกาโรสเจล ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism) ร่วมกับทำการทดสอบหาความแตกต่างของสารพันธุกรรม ด้วยวิธี DNA-DNA hybridization โดยใช้วิธี photobiotin labeling method

Tanticharoenia sakaeratensis เป็นแบคทีเรียกรดน้ำส้มจีนัสใหม่และสปีชีส์ใหม่ที่คัดแยกได้จากดินในอำเภอสแกราช จังหวัดนครราชสีมา ได้ถูกนำเสนอในปี 2008 โดย Yukphan และคณะซึ่งเป็นสกุลที่ 11 ของ family *Acetobacteraceae* โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสบน 16S rDNA (16S rDNA gene sequencing) และทำการทดสอบหาความแตกต่างของสารพันธุกรรมด้วยวิธี DNA-DNA hybridization โดยใช้วิธี photobiotin labeling method

ในปี 2009 Yukphan และคณะได้ เสนอ แบคทีเรียกรดน้ำส้ม สกุลที่ 12 คือ *Ameyamaea* เป็นแบคทีเรียกรดน้ำส้มสกุลใหม่ที่แยกได้จากดอกขิงแดง ในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย

2.1 ลักษณะของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู

แบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปร่างรีจนถึงท่อน ขนาดของเซลล์ประมาณ 0.6-0.8 x1.0-4.0 ไมโครเมตร การจัดเรียงตัวของเซลล์มีหลายลักษณะ อาจพบเป็นเซลล์เดียว จับกันเป็นคู่ หรือเรียงต่อกันเป็นสายยาวคล้ายโซ่ ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูมีสีชมพู สีขาวหรือสีครีม ต้องการอากาศในการดำรงชีวิต (obligately aerobic) มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย(terminal electron acceptor) ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงอาหาร สายพันธุ์ที่ไม่สร้างรงค์วัตถุสีน้ำตาล จะพบมากในสกุล *Acetobacter* และ*Gluconacetobacter* แบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูอยู่ใน Family Acetobacteraceae ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบกรด (acidophillic) จัดอยู่ใน α -subdivision ของ *Proteobacteria* (De Ley *et al.,* 1984 ; และ Sieve *et al.,* 1994) สายพันธุ์ที่อยู่ใน family นี้สามารถเจริญได้ดีที่มีความเป็นกรด-ด่างต่ำและสามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกได้โดยเกิดปฏิกิริยา แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส (alcohol dehydrogenase) หรือ (ADH) และอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจิเนส (aldehyde dehydrogenase) หรือ (ALDH) ซึ่งอยู่บนเยื่อหุ้มไซโทพลาสซึมและในห่วงโซ่ การหายใจ ลักษณะความแตกต่างของแต่ละสกุลของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูแสดงในตารางที่ 2.1 และตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 **ลักษณะที่แตกต่างของสกุล** *Acetobacter, Gluconobacter, Acidomonas, Gluconacetobacter* **และ** *Asaia*

ลักษณะ	*Acetobacter*	*Gluconobacter*	*Acidomonas*	*Gluconacetobacter*	*Asaia*
Flagellation	Peritri chous or non- motile	Polar or non-motile	Motile ro non-motile	Peritri chous or non- motile	Peritri chous or non-motile
Pigmentation	-	+	-	-	+ or -
Production of water soluble brown pigment(s)	-	+ or -	-	+ or -	-
Production of cellulose	-	-	-	+ or -	-
Production of mucous substance(s) from sucrose	+ or -	-	-	+	-
Oxidation of Acetate	+	-	+	+	w
Oxidation of Lactate	+	-	-	+	w
Production of acetic acid from ethanol	+	+	+	+	-
Growth in present of 0.3%(v/v) acetic acid in $CaCO_3$-free AG broth at pH 3.5	+	+	+	+	-
Growth in the present of 30% D-glucose	-	-	nd	+ or -	+
Growth on D-mannitol	w	+	nd	+	+
Growth on glutamate agar	+	-	nd	+	+
Assimilation of ammonium Nitrogen on Hoyer-Frateur medium D-glucose D-mannitol Ethanol	 - - + or -	 + + -	 nd nd nd	 + or – + or – -	 + + -
Utilization of methanol	-	-	+	-	-

ตารางที่ 2.1 **(ต่อ)**

ลักษณะ	*Acetobacter*	*Gluconobacter*	*Acidomonas*	*Gluconacetobacter*	*Asaia*
Ketogemesis from glycerol	+ or -	+	-	+ or -	+ or -
Production of keto-D-gluconates from D-glucose					
2-keto-D-gluconate	+ or –	+	-	+	+
5-keto-D-gluconate	+ or –	+	-	+ or –	+
2,5-diketo-D-gluconate	-	+ or -	-	+ or -	-
Acid production					
L-arabinose	+ or –	+	+	+ or –	+
D-arabinose	-	+	+	-	+
D-Xylose	+ or –	+	+	+ or –	+
L-rhamnose	-	-	-	-	+ or –
D-glucose	+ or –	+	+	+	+
D-galactose	+ or –	+	+	+	+
D-mannose	+ or –	+	+	+ or –	+
D-fructose	-	+	-	+	+
L-sorbose	-	+	nd	+ or –	+
Melibiose	-	+	+	-	+
Sucrose	-	+	-	-	+
Raffinose	-	-	nd	-	-
D-mannitol	-	+	-	+ or –	+ or –
D-sorbitol	-	+	-	-	+ or –
Dulcitol	-	-	-	-	+
Glycerol	-	+	+	+	+
Ethanol	+	+	+	+	-
Major ubiquinone	Q-9	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10
G+C content (mol %)	52-60	51-63	63-66	55-66	59-61

หมายเหตุ : + : ผลบวก, - : ผลลบ, w : ปฏิกิริยาอ่อนมาก, nd :ไม่ได้ทำการทดสอบ

ที่มา : Lisdiyanti *et al*., 2004 : Yukphan, 2004 : Yamashita, 2004 : Loganathan and Nair, 2004 : Yukphan *et al* ., 2006

ตารางที่ 2.2 **ลักษณะที่แตกต่างของสกุล** *Kozakia, Swaminathania, Saccharibacter, Neoasaia* **และ** *Granulibacter*

ลักษณะ	*Kozakia*	*Swaminathania*	*Saccharibacter*	*Neoasaia*	*Granulibacter*
Flagellation	Non-motile	Non-motile	Non-motile	Non-motile	Non-motile
Pigmentation	-	nd	nd	nd	+
Production of water soluble brown pigment(s)	-	+	-	-	nd
Production of cellulose	-	nd	nd	nd	nd
Production of mucous substance(s) from sucrose	+	nd	nd	nd	nd
Oxidation of Acetate	w	w	-	-	w
Oxidation of Lactate	w	w	w	-	+
Production of acetic acid from ethanol	+	+	w/-	+	nd
Growth in present of 0.3%(v/v) acetic acid in $CaCO_3$-free AG broth at pH 3.5	+	+	-	+	nd
Growth in the present of 30% D-glucose	-	-	+	nd	nd
Growth on D-mannitol	+	nd	nd	+	w
Growth on glutamate agar	-	+	+	+	+
Assimilation of ammonium Nitrogen on Hoyer-Frateur medium D-glucose D-mannitol Ethanol	 + or – + -	 nd nd nd	 - - -	 - w -	 nd nd nd
Utilization of methanol	-	nd	nd	nd	+
Ketogemesis from glycerol	+	nd	nd	nd	nd

ตารางที่ 2.2 **(ต่อ)**

ลักษณะ	*Kozakia*	*Swaminathania*	*Saccharibacter*	*Neoasaia*	*Granulibacter*
Production of keto-D-gluconates from D-glucose					
2-keto-D-gluconate	+	nd	nd	nd	nd
5-keto-D-gluconate	+	nd	nd	nd	nd
2,5-diketo-D-gluconate	-	nd	nd	nd	nd
Acid production					
L-arabinose	+	nd	nd	nd	nd
D-arabinose	+ or –	nd	-	w	nd
D-Xylose	+	w	+	+	-
L-rhamnose	-	-	-	w	nd
D-glucose	+	nd	nd	+	+
D-galactose	+	nd	nd	nd	nd
D-mannose	+	nd	nd	nd	nd
D-fructose	-	w	nd	+	nd
L-sorbose	-	nd	-	-	nd
Melibiose	+	nd	+	+	nd
Sucrose	+ or –	nd	+	+	-
Raffinose	+	nd	-	+	nd
D-mannitol	-	-	+	w	-
D-sorbitol	-	+	-	+	-
Dulcitol	-	w	-	w	nd
Glycerol	+	+	-	+	+
Ethanol	+	+	-	+	+
Major ubiquinone	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10
G+C content (mol %)	56-57	57.6-59.9	52.3	63.1	59

หมายเหตุ : + : ผลบวก, - : ผลลบ, w : ปฏิกิริยาอ่อนมาก, nd :ไม่ได้ทำการทดสอบ

ที่มา : Yukphan, 2004 : Yamashita, 2004 : Loganathan and Nair, 2004 : Yukphan *et al* ., 2006

สำหรับแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู ในปี 2011 Sengun and Karabiyikli ได้จำแนกออกเป็น 12 สกุล ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.1.1 *Acetobacter* (Beijerinck, 1898)

Acetobacter มีรูปร่างเป็นรูปไข่ ท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อยขนาด 0.6-0.8 x 1.0-4.0 ไมโครเมตร พบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเรียงกันเป็นเส้นสาย บางสายพันธุ์อาจพบลักษณะเป็นเกลียวยืดยาว บวม รูปกระบอก โค้งหรือเป็นสาย มีทั้งเคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ จะมีแฟลกเจลลารอบเซลล์ (peritrichous flagella) ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ติดสีแกรมลบ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (obligately aerobic) ไม่เกิดการหมัก ส่วนมากไม่สร้าง รงควัตถุโคโลนีมีสีขาวสามารถออกซิไดซ์ อะซิเตทและแลกเตท ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และน้ำ (H_2O) (De Ley and Swing, 1984) *Acetobacter* มียูบิควิโนน-9 (Q-9) (Yamada *et al.,* 1968) ผลิตเอนไซม์คะตะเลส (catalase) แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) ไม่ย่อยสลายเจลลาติน ผลิตอินโดล สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแอมโมเนียจากแอล-อาร์จินิน (L-arginine) แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของเชื้อ คือ เอทานอล (ethanol) กลีเซอรอล (glycerol) และแลกเตท (lactate) สามารถสร้างกรดจากเอ็น-โพรพานอล (*n*-propanol) เอ็น-บิวทานอล (*n*-butanol) และดี-กลูโคส (D-glucose) ไม่ย่อยแลกโตสและแป้ง อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียสช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 5.4-6.3 (Holt *et al.,* 1994) ปัจจุบันมีสมาชิกทั้งหมด 16 สายพันธุ์ ได้แก่ *Acetobacter aceti*, *A. orleanensis*, *A. estunensis*, *A. indonesiensis*, *A. tropicalis*, *A. cibinongensis*, *A. orientalis*, *A. cerevisiae*, *A. malorum*, *A. oeni*, *A.nitrogenifigens*, *A. pasteurianus*, *A. peroxydans*, *A. pomorum*, *A. lovaniensis*, *A. syzygii* (Sokollek et al., 1998; Lisdiyanti et al., 2000, 2001; Cleenwerck et al., 2002; Silva et al., 2006; Dutta and Gachhui, 2006)

2.1.2 *Gluconobacter* (Asai, 1935)

เซลล์มีรูปร่างรีถึงเป็นท่อน ขนาด 0.5-1.0 x 2.6-4.2 ไมโครเมตร พบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ไม่ค่อยพบต่อกันเป็นสายยาว อาจพบเป็นเซลล์ผิดปกติขนาดใหญ่ (Holt *et al.,*1989) ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ติดสีแกรมลบ มีทั้งแบบเคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ ถ้าเคลื่อนที่ได้จะมี polar flagella 3-8 อันโคโลนีสีขาวหรือสีครีม มีลักษณะคล้ายกับสกุล *Acetobacter* แต่แตกต่างกันที่ไม่สามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและเลกเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ(De Ley and Swing, 1984) มียูบิควิโนน-10 (Q-10) (Yamada *et al.,* 1968) ผลการทดสอบออกซิเดส (oxidase) การรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction) และการผลิตอินโดล (indole) เป็นลบ ไม่ย่อย

เจลลาติน สร้างคีโตนจากโพลีแอลกอฮอล์อย่างรวดเร็ว (strong ketogenesis) สร้างจากกรดน้ำตาลดี-กลูโคส และดี-ไซโลสทุกสายพันธุ์มีการผลิตกรด 2-คีโตน กลูโคนิก (2-ketogluconic acid) และกรด 5-คีโตน กลูโคนิก (5-ketogluconic acid) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 5.5-6.0 ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่พีเอสต่ำ (pH 3.6) (Holt *et al.,* 1994) ปัจจุบันมีสมาชิกทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Gluconobacter oxydans, G. asai, G. cerinus, G. albidus, G. thailandicus* (Somboon *et al.,* 2004)

2.1.3 *Acidomonas* (Urakami *et al*., 1989)

Acidomonas ประกอบด้วยสมาชิกเพียงสายพันธุ์เดียวคือ *Acidomonas methanolica* (Urakami *et al*., 1989) ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูตัวอื่นๆ เนื่องจากสามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ดีกว่ากลีเซอรอลหรือกลูโคส *Acidomonas* มี ยูบิควิโนน-10 (Urakami *et al*.,1989). *Acidomonas* มีขนาด 0.8-1.0 x 1.5-3.0 ไมโครเมตร เซลล์ไม่เคลื่อนที่ ลักษณะโคโลนีบนอาหาร peptone-yeast extract-malt extract มีลักษณะเป็นมัน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวจนถึงเหลืองอ่อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ให้ผลการทดสอบออกซิเดสคะตาเลสและยูรีเอสเป็นบวก และให้ผลการทดสอบ อินโดล การรีดิวซ์ไนเตรทและโวเจสโพรสเคอร์ (Voges-Proskauer)เป็นลบ ไม่ย่อยเจลลาตินและแป้งสร้างกรดอะซิติกจากเอทานอล ผลิตกรดจากน้ำตาลดี-กลูโคส สามารถใช้เมทานอล เอทานอล กรดอะซิติก น้ำตาลดี-กลูโคส กลีเซลรอล และเพคติน (pectin) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แต่ไม่สามารถใช้แอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ดี-ไซโลส (D-xylose) ดี-ฟรุกโตส (D-frutose) ดี-กาแลคโตส (D-galactose) มอลโตส (maltose) ซูโครส (sucrose) แลกโตส (lactose) ทรีฮาโลส (trehalose) ดี-ซอร์บิทอล (D-sorbitol) ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) อินนอซิทอล (inositol) กลีเซลรอล (glycerol) แป้ง กรดซิตริก (citric acid) กรดแลคติก (lactic acid) เมทิลลามีน (methylamime) มีเทน (methane) หรือไฮโดรเจน บางสายพันธุ์ใช้ ดี-แมนโนส (D-mannose) ได้เล็กน้อย ต้องการแคลเซียม แพนโททีเนต (calcium pantothenate) ในการเจริญ สามารถเจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 3.0-5.0 ไม่สามารถเจริญที่ความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 6.0 หรือต่ำกว่า 1.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญ คือ 30 และ 37 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และไม่เจริญในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์

2.1.4 *Gluconacetobacter* (Yamada *et al.,* 1997)

Gluconacetobacter เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นรูปท่อน พบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นสาย หรือเป็นกลุ่มเล็ก มี peritrichously flagellated เคลื่อนที่ได้ โคโลนีมีลักษณะนูน เรียบ ออกซิไดซ์ อะซิเตทและแลกเตท ให้ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ เจริญบน แมนนิทอล อะการ์ มียูบิควิโนน-10 เช่นเดียวกับสกุล *Gluconobacter* มีการผลิตกรดจาก ดี- กลูโคส(D-glucose), ดี-แมนโนส(D-manaose), ดี-ไซโลส(D-xylose) และเอทานอล (Ethanol) ผลิต 5- คีโต กลูโคเนต(5-keto-D-gluconate) และ 2 – คีโต กลูโคเนต(2-keto-D-gluconate) จาก ดี-กลูโคส(D-glucose) และ ไดไฮดรอกซีอะซิโตน(dihydroxyacetone) จากกลีเซอรอล มี G+C content ในอัตรา 54.9 – 66.4 mol% แบคทีเรียสกุลนี้มีลักษณะคล้ายกับ *Acetobacter* คือสามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและแลกเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ ปัจจุบันประกอบด้วยสมาชิก 13 สายพันธุ์ได้แก่ *Gluconacetobacter sacchari, Ga. liquefaciens, Ga. diazotrophicus, Ga. azotocaptans, Ga. johannae, Ga. hansenii, Ga. entanii* , *Ga. rhaeticus, Ga. oboediens, Ga. intermedius, Ga. xylinus, Ga. europaeus, Ga. swingsii* (Yamada *et al.,* 1997,1998 : Dellaglio *et al.,* 2005 : Lisdiyanti *et al*., 2006)

2.1.5 *Asaia* (Yamada *et al.,* 2000)

Asaia มีลักษณะแตกต่างจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูตัวอื่นๆ เนื่องจากไม่สามารถผลิตกรดหรือผลิตอะซิติกได้น้อย สกุล *Asaia* แบ่งออกเป็น 3 สายพันธุ์ คือ *Asaia bogorensis* (Yamada *et al.,* 2000) และ *As. siamensis* (katsura *et al.,* 2001) และ *As. krunkthepensis* (Yukphan *et al*., 2004) มีทั้งสายพันธุ์ที่เคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ สายพันธุ์ที่เคลื่อนที่ได้จะมีแฟลกเจลลาแบบรอบเซลล์ สามารถเจริญได้ในอาหารทดสอบที่มีความเป็นกรด-ด่าง 3.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ได้ แต่ถูกยับยั้งการเจริญในอาหารทดสอบที่มีกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.35 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถเจริญ ในอาหารที่มีเฉพาะเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตไดไฮดรอกซีอะซีโตน (dihydroxyacetone) จากกลีเซอรอลได้น้อยมาก สามารถผลิตกรด 2-คีโตกลูโคนิก (2-ketogluconic-acid) และกรด 5-คีโตกลูโคนิก (5-ketogluconic-acid) แต่ไม่สามารถผลิตกรด 2,5 ไดคีโตกลูโคนิค (2,5-diketogluconic-acid) จากน้ำตาลดี- กลูโคส ผลิตกรดจากน้ำตาล ดี-กลูโคส(D-glucose) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-ฟลุกโตส (D-fructose) แอล-ซอร์โบส (L-sorbose) ไรบิทอล (ribitol) กลีเซอรอล (glycerol)และเมลลิไบโอส (melibiose)

แต่ไม่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลแลคโตสและมอลโตส *Asaia bogorensis* สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลดอลซิทอล(dulcitol) ได้ แต่ *As. siamensis* ไม่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลดอลซิทอล (dulcitol)ได้ และ มี ยูบิควิโนน 10 (Q-10) เป็นยูบิควิโนนหลัก

2.1.6 *Kozakia* (Lisdiyanti *et al.,* 2002)

Kozakia เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน เซลล์ไม่เคลื่อนที่ ขนาด 2.0-3.0 ไมโครเมตร เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น (strictly aerobic) ให้ผลการทดสอบคะตะเลสเป็นบวก และให้ผลการทดสอบออกซิเดสเป็นลบ ไม่สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลที่ละลายน้ำจากน้ำตาลดี-กลูโคส ไม่สามารถย่อยสลายเจลลาตินไม่มีการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogensulfide ; H_2S) ให้ผลการทดสอบอินโดล และการรีดิวส์ไนเตรทเป็นลบ สามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและแลคเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำได้ แต่จะเกิดปฏิกิริยาช้ามาก ผลิตกรดอะซิติกจากเอทานอล กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.35 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ สามารถเจริญบนอาหารแมนนิทอล อะการ์ (mannitol agar) แต่ไม่สามารถเจริญบนอาหารกลูตาเมทอะการ์ (glutamate agar) ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์ได้ ไม่ใช้เมทานอล ผลิต ไดไฮดรอกซีอะซิโตน จาก กลีเซอรอล ผลิต ดี-กลูโคเนต (D-gluconate) 2-คีโต-ดี-กลูโคเนต (2-keto-D-gluconate) และ 5-คีโต-ดี-กลูโคเนต(5-keto-D-gluconate) จากน้ำตาลดี-กลูโคเนต แต่ไม่สร้าง 2,5-ไดคีโต-ดี-กลูโคส (2,5diketo-D-glucose) ผลิตกรดจากแอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ดี-ไซโลส (D-xylose) ดี-กลูโคส (D-gluecose) ดี-กาแลคโตส (D-galacttose) ดี-แมนโนส (D-mannose) เมลลิไบโอส (melibiose) ราฟฟิโนส (rafinose) มีโซ-อิริทริตอล (meso-etrythritol) กลีเซอรอล (glycerol)และเมทานอลแต่ไม่ผลิตกรดจาก แอล-แรมโนส (L-rhamnose) ดี-ฟลุกโตส (D-fructose) แอล-ซอร์โบส (L-sorbose)แลคโตส (lactose) ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ดี-ซอร์บิทอล (D-sorbitol) ดอลซิทอล (dulcitol) การผลิตกรดจากน้ำตาล ดี-อะราบิโนสและน้ำตาลจากซูโครสแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของเชื้อสกุล *Kozakia* มียูบิควิโนน 10 (Q-10) เป็นยูบิควิโนนหลัก มีเพียงหนึ่งสายพันธุ์คือ *Kozakia baliensis*

2.1.7 *Swaminathania* (Loganathan and Nair, 2004)

Swaminathania เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปร่างเป็นแท่งจนถึงกลม ขนาดของเซลล์ 0.7-0.9 x 1.9-3.1 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลารอบเซลล์ ผลทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสเป็นลบแต่ คะตะเลส เป็นบวก สามารถออกซิไดส์เอทานอลกับอะซิติกในสภาวะเป็นกลางได้ และสามารถออกซิไดซ์ อะซิเตทและแลคเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ สร้างเม็ดสีสีน้ำตาลที่ละลายน้ำได้บนอาหาร GYC agar medium ไม่สามารถไฮโดรไลส์เจลลาตินและ

แป้งได้ เจริญได้ดีในกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.35 เปอร์เซ็นต์ เจริญได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตกรดจาก แอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ดี-กลูโคส (D-gluecose) กลีเซอรอล (glycerol) เอทานอล (ethanol) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-กาแลคโตส (D-galacttose) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของซอร์บิทอล และมียูบิควิโนน-10 (Q-10) เป็นยูบิควิโนนหลัก ส่วนประกอบของ DNA base มี G+C content 57.6-59.9 โมลเปอร์เซ็นต์

2.1.8 *Saccharibacter* (Jogima *et al*., 2004)

Saccharibacter เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ เซลล์รูปร่างเป็นแท่ง ขนาดของเซลล์ 0.8-1.0 x 2.5-4.0 ไมโครเมตร สร้างเอนไซม์คะตะเลสให้ผลเป็นบวก ไม่สร้างเอนไซม์ ออกซิเดส ไม่พบการสร้างเม็ดสี ไม่สร้างเมือกและเซลลูโลส ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อ การเจริญ ประมาณ 5.0-7.0 ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ต่ำกว่า 4.0 หรือมากกว่า 8.0 และสามารถเจริญได้ในสภาวะมีกลูโคส 2-40% เจริญได้ในอาหารที่มีกลูตาเมทมากถึง 7% และสามารถเจริญบนแมนนิทอลอาการ์ แต่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกลูตาเมท เพียง 1 เปอร์เซ็นต์ ผลิตกรดกลูโคนิค (gluconic acid) 2-คีโต-ดี-กลูโคนิค (2-keto-D-gluconic acid) และ 5-คีโต-ดี- กลูโคนิค (5-keto-D-gluconic acid) จากกลูโคส และเจริญได้ดีมากถ้าความเข้มข้นกลูโคสสูง สามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและแลคเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ ไม่สามารถใช้เมทานอลได้ ไม่ผลิตไดไฮดรอกซีอะซีโตน (dihydroxyacetone) แต่ผลิตกรดจากแอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ดี-ไซโลส (D-xylose) ดี-กาแลคโตส (D-galacttose) การผลิตกรดจากแอลซอร์โบส (L-sorbose) บางครั้งอาจเปลี่ยนแปลงได้ และมียูบิควิโนน-10 (Q-10) ส่วนประกอบของ DNA base มี G+C content อยู่ในช่วง 52-53 โมลเปอร์เซ็นต์

2.1.9 *Neoasaia* (Yukphan, 2005)

Neoasaia เป็นสายพันธุ์ในกลุ่มของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูใน α-proteobacteria *Neoasaia chiangmaiensis* เป็นแบคทีเรียที่ค้นพบในประเทศไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้คัดแยกได้จากดอกไม้ที่มีสีน้ำตาลออกเหลือง เจริญได้ที่ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 โดยใช้อาหารที่มีองค์ประกอบของ 0.3 เปอร์เซ็นต์กลูโคส เอทานอล และกรดอะซิติก ผลการทดสอบทางพันธุกรรมพบว่ามีความใกล้ชิดกับ *Kozakia* โดยใช้การวิเคราะห์ในส่วนของ 16S rDNA ลักษณะเฉพาะของเซลล์คือ ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีสีชมพู กลมนูน ขอบเรียบ สร้างเม็ดสี สีน้ำตาล (brown pigment) ได้ สามารถผลิตกรดอะซิติกจากเอทานอลได้ สำหรับการ

ออกซิเดชัน ของ อะซิเตทและแลกเตทให้ผลเป็นลบเหมือนกับ *Gluconobacter* เจริญได้ใน อาหารกลูตาเมท อะการ์ (glutamate agar) แมนนิทอล อะการ์ (mannitol agar) และใน 30 เปอร์เซ็นต์ ดี-กลูโคส (30% D-glucose) เจริญได้ดีใน 0.35 เปอร์เซ็นต์กรดอะซิติก แต่ไม่เจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) สามารถผลิตไดไฮดรอกซีอะซีโตน (dihydroxyacetone) จาก กลีเซอรอล แต่ไม่ผลิต โพลีแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างคล้ายลีแวน (leven-like polysaccharide) บนอาหารซูโคส (sucrose medium) มียูบิควิโนน 10 (Q-10) เป็นยูบิควิโนนหลัก ส่วนประกอบของ DNA base มี G+C content 63.1 โมลเปอร์เซ็นต์

2.1.10 *Granulibacter* (Greenberg *et al*., 2006)

Granulibacter เป็นแบคทีเรียแกรมลบ พวก aerobic มีรูปร่างแบบแท่งจนถึงกลม เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วย chronic granulomatous disease (CGD) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส และช่วงความเป็นกรด-ด่าง 5.0-6.5 สร้างเม็ดสีสีเหลือง (yellow pigment) การทดสอบสามารถออกซิไดซ์ อะซิเตทและแลกเตทให้ผลเป็นบวกแต่อะซิเตทสามารถออกซิไดซ์ได้ช้ากว่า ผลิตกรดอะซิติกได้เล็กน้อยจากเอทานอล และอาจจะสามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งพลังงานได้ มียูบิควิโนน 10 (Q-10) เป็นยูบิควิโนนหลัก ส่วนประกอบของ DNA base มี G+C content 63.1 โมลเปอร์เซ็นต์

2.1.11 *Tanticharoenia* (Yukphan *et al*., 2008)

Tanticharoenia เป็นแบคทีเรียกรดน้ำส้มที่ทนแรงดันออสโมติกได้สามารถเจริญได้ใน อาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ มีรูปร่างเป็นท่อนติดสีแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ มีขนาด 0.6-0.8x1.0-1.6 ไมโครเมตร โคโลนีมีสีครีม มีลักษณะเรียบ ขอบเรียบ ไม่สามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและแลคเตท ผลิตรงควัตถุสีน้ำตาลที่ละลายน้ำ ไม่สามารถใช้เมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอน มียูบิควิโนน 10 เป็น ยูบิควิโนนหลัก ส่วนประกอบของ DNA base มี G+C content 64.5-65.6 โมลเปอร์เซ็นต์

2.1.12 *Amayamaea* (Yukphan *et al*., 2009)

Ameyamaea เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน เคลื่อนที่ได้ด้วย เฟลกเจลลาที่ขั้วมีขนาดของเซลล์ 0.6-0.8x1.0-1.8 ไมโครเมตร โคโลนีมีสีครีม มีลักษณะเรียบ ขอบเรียบ เมื่อเจริญบนกลูโคส-เอธานอล-แคลเซียมคาร์บอเนตอาการ์ ออกซิไดซ์อะซิเตทได้แรงแต่ออกซิไดซ์แลกเตทได้อ่อน เจริญบนอาหารวุ้นกลูตาเมตได้เล็กน้อย ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์ เจริญบนอาหารที่มีเมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้เล็กน้อย ไม่ผลิตรงควัตถุสี

น้ำตาล มียูบิควิโนน 10 เป็น ยูบิควิโนนหลัก ส่วนประกอบของ DNA base มี G+C content 66.0-66.1 โมลเปอร์เซนต์

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูจากแหล่งธรรมชาติ

เนื่องจากประเทศไทยมีตัวอย่างที่หลากหลายจึงสามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูที่มีประสิทธิภาพได้หลายสายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมในประเทศไทยได้ดี สำหรับรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูในประเทศไทยมีดังนี้

นันทพร (2517) คัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูจำนวน 55 strains จากองุ่นเขียว องุ่นแดง ส้ม น้อยหน่า สับปะรด เงาะ กล้วย ผลตาลสุก ลางสาด ฝรั่ง น้ำส้มสายชูที่ยังไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ น้ำตาลเมาและเหล้าขาว ในจำนวนนี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูที่เหมาะสมต่อการหมักน้ำส้มสายชูได้ทั้งสิ้น 5 strains คือ หมายเลข 24 แยกได้จากองุ่นเขียว ผลิตกรดได้ 6.23, 5.25 และ 4.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเชื้อหมายเลข 51 แยกได้จากน้อยหน่าสามารถผลิตกรดได้ 4.70 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 5 strains ที่คัดเลือกได้นี้สามารถเจริญและผลิตกรดในสภาวะที่มีแอลกอฮอล์ได้สูงถึง 12 เปอร์เซ็นต์และสามารถทนต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์ถึง 100 ส่วนต่อล้านส่วน จากการศึกษาสมบัติและจำแนกแบคทีเรียหมายเลข 24, 36, 51และ 52 มีสมบัติตรงกับ *Acetobacter aceti* และแบคทีเรียหมายเลข 35 มีคุณสมบัติตรงกับ *Acetobacter mesoxydans* ทั้ง 5 strains ที่คัดเลือกได้นี้เมื่อให้กรดสูงสุดแล้วจะออกซิไดซ์กรดต่อไปอย่างช้าๆ จึงไม่เป็นอุปสรรคต่อการใช้ในอุตสาหกรรม

รสสุคนธ์ (2528) แยกแบคทีเรียจากลูกแป้งข้าวหมาก สุรา ไวน์น้ำตาลสด น้ำมะพร้าว น้ำส้มสายชูที่ยังไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ และผลไม้สุกงอม เช่น องุ่น สับปะรด และส้ม และได้คัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อวิธีการผลิต จากเชื้อ 310 strains ซึ่งแยกได้จาก 269 ตัวอย่าง และแบคทีเรียบริสุทธิ์ 4 strains ได้แก่ *Acetobacter aceti* 104, *Acetobacter aceti* I, *Acetobacter rancens* I, *Acetobacter* sp. 28-1, *Acetobacter* sp. 65-1, *Acetobacter* sp. 88-1, *Acetobacter* sp. 170-1, *Acetobacter* sp. 256-2, *Acetobacter* sp. 249-1, *Acetobacter aceti* 103 ที่ผลิตกรดได้ดีในน้ำมะพร้าวที่มีเอทานอล 8 เปอร์เซ็นต์ และจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้ มี 4 strains ที่ยังคงสร้างกรดได้ดี เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *Acetobacter aceti* 103, *Acetobacter aceti* I, *Acetobacter* sp. 65-1 และ *Acetobacter* sp. 170-1 สายพันธุ์เหล่านี้ไม่ต้องการสารอาหารเพิ่มและสามารถผลิตกรดในน้ำมะพร้าวที่เจือจางในสัดส่วนต่างๆ กัน แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ผลิตกรด

ได้ดีที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส และพบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ 7 strains สามารถผลิตกรดได้สูงกว่า 3.5 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งในจำนวน 6 strains ยังคงผลิตกรดสูงกว่า 1.9 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งได้แก่ *Acetobacter aceti* 103, *Acetobacter aceti* I, *Acetobacter* sp. 65-1, *Acetobacter* sp. 170-1, *Acetobacter* sp. 249-1 และ *Acetobacter* sp. 256-2 สายพันธุ์เหล่านี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชูหรือการหมักแบบอาหารเหลวโดยสามารถลดต้นทุนการผลิตในด้านการหล่อเย็น (cooling system)

ภัทราภรณ์ (2545) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู 35 ตัวอย่าง จากผลไม้และดอกไม้ในประเทศไทย โดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทด์, ระบบยูบิควิโนนและระดับความใกล้เคียงของ DNA คัดแยกได้ 22 strains ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้ระบบยูบิควิโนน พบว่า 17 strains จาก 22 strains มียูบิควิโนนเป็นแบบ Q-10 ซึ่งจำแนกได้เป็น *Gluconobacter* 2 strains และ *Gluconacetobacter* 3 strains ถูกแยกความแตกต่างออกเป็นกลุ่มๆ โดยใช้ พื้นฐานความใกล้เคียงของ DNA มี 4 กลุ่ม ที่สามารถจำแนกได้โดยใช้พื้นฐานนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 12 strains ซึ่งจัดจำแนกเป็น *Acetobacter pasteurianus* กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย 2 strains ซึ่งจำแนกเป็น *Gluconacetobacter hansenii* กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วย 2 strains ซึ่งจำแนกเป็น *Gluconobacter asaii* และกลุ่มที่ 9 ประกอบด้วย 1 strains ซึ่งจำแนกเป็น *Gluconobacter oxydans* นอกนั้น 5 กลุ่ม (กลุ่มที่ 2-5 และกลุ่มที่ 7) จำแนกโดยใช้ ความใกล้เคียงของ 16S rDNA และการวิเคราะห์ phylogenetic tree สายพันธุ์ HKKU 47 ในกลุ่มที่ 2 จำแนกเป็น *Acetobacter uropicalis* ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียง 16S rDNA 99.85% สายพันธุ์ HKKU66 ในกลุ่มที่ 5 จำแนกเป็น *Acetobacter orleanensis* ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียง 16S rDNA 99.11% สายพันธุ์ HKKU4 และ HKKU44 ในกลุ่มที่ 3 จำแนกเป็น *Acetobacter lovaniensis* ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียง 16S rDNA 99.85% และ99.93% ตามลำดับส่วนสายพันธุ์ HKKU15 และ HKKU130 อาจเป็นสายพันธุ์ใหม่ สายพันธุ์ HKKU15 (กลุ่มที่ 5) จำแนกเป็น *Acetobacter* sp. *Nov* และสายพันธุ์ SKU 130 (กลุ่มที่ 7) จำแนกเป็น *Gluconacetobacter* sp.

สำหรับในประเทศญี่ปุ่นได้มีการรายงานการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูดังนี้ Ohmori *et al.*,(1980) ได้ทำการแยกแบคทีเรียจากน้ำหมัก (vinegar mash), ดินในโรงงานน้ำส้มสายชู ผลไม้ แล้วทำการทดสอบการออกซิไดซ์เอทานอลที่อุณหภูมิสูงและจำแนกแบคทีเรีย พบว่า *Acetobacter aceti* NO1023 มีอัตราการหมักกรดน้ำส้มแบบต่อเนื่องได้ 100 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสและ 45 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นการใช้

แบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูสายพันธุ์ *Acetobacter aceti* NO1023 จะช่วยลดค่าใช้จ่ายของระบบหล่อเย็นในการผลิตน้ำส้มสายชูในระดับอุตสาหกรรมได้ คุณสมบัติการทนอุณหภูมิสูงของ *Acetobacter aceti* NO1023 มีความสัมพันธุ์ต่อการทนต่อกรดน้ำส้ม เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีเอทานอล พบว่าเซลล์สูญเสียความสามารถในการทนต่อกรดน้ำส้มในอัตราสูงมาก (55 เปอร์เซ็นต์ในสายพันธุ์ที่คัดแยกได้) และสูญเสียความสามารถในการออกซิไดซ์เอทานอลในอัตราที่ต่ำ (ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์) ใน stationary growth phase และพบเซลล์ที่สูญเสียคุณสมบัติเหล่านี้มีโอกาสจะกลับมามีสมบัติดังเดิมน้อยกว่า $1/10^9$ เซลล์ซึ่งเป็นไปได้ว่าการสูญเสียความสามารถในการทนต่อกรดน้ำส้มและการออกซิไดซ์เอทานอลเป็นสาเหตุมาจากพลาสมิดดีเอ็นเอ หรือสารพันธุ์กรรมบางอย่างขาดหายไป (Ohmori *et al.,* 1980)

Saeki it *et al.,* (1997) ศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูที่ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant strain) ซึ่งแยกในประเทศไทย พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตกรดน้ำส้มได้สูงที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส และเมื่อใช้ความเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม 4 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียยังคงออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดน้ำส้ม ขณะที่สายพันธุ์ mesophilic (สายพันธุ์ IFO) สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดน้ำส้มที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ได้เฉพาะที่สภาวะที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดน้ำส้ม 2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้แบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูที่ทนอุณหภูมิสูงสามารถออกซิไดซ์เอทานอลที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 9 เปอร์เซ็นต์ โดยปราศจาก lag time ส่วนการหมักน้ำส้มสายชูแบบอาหารเหลว (submerged culture) ที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ประสบความสำเร็จเช่นเดียวกับการหมักน้ำส้มสายชูแบบ static culture และหมักน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส โดยสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง มีอัตราการหมักและประสิทธิภาพการหมักสูงกว่าสายพันธุ์ mesophilic ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 2-3 เท่าดังนั้นการใช้แบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูที่ทนอุณหภูมิสูงในการหมักน้ำส้มสายชูที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส จึงมีประโยชน์ในการช่วยลดค่าใช้จ่ายในระบบหล่อเย็น นอกจากนี้ ในปี 1997 Saeki it และคณะ ได้ศึกษาการเกิดอะซิเตทออกซิเดชั่นของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูในสกุล *Acetobacter* พบว่าเมื่อแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในอาหารถูกใช้หมดเหลือเพียงกรดน้ำส้มใน late stationary phase แบคทีเรียจะเริ่มใช้กรดน้ำส้มที่สะสมอยู่ในอาหารและเจริญอย่างรวดเร็วใน stationary phase ซึ่งเซลล์จากการเจริญในช่วงแรกจะทนต่อกรดน้ำส้ม ขณะที่เซลล์จากการเจริญในช่วงหลังจากสารอาหารหมดจะไม่ทนต่อกรดน้ำส้ม อย่างไรก็ตามอะซิเตท ออกซิเดชัน (acetate oxidation) จะไม่เกิดขึ้นถ้าเอทานอลยังถูกออกซิไดซ์ และมีแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อและใน vinegar mash มีกรดน้ำส้มสะสม

มากกว่าร้อยละ 4.5 แต่ถ้าความเข้มข้นสุดท้ายของกรดน้ำส้มสะสมน้อยกว่าร้อยละ 3.7 แบคทีเรียจะเกิดการออกซิไดซ์ อะซิเตท เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแต่กรดน้ำส้มเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานจะเกิดช่วง lag time ยาว เชื้อจะใช้กรดน้ำส้มหลัง lag time และ lag time ถูกทำให้สั้นลงได้โดยการเติมแหล่งคาร์บอนเพียงเล็กน้อย เช่น เอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อจากการวิเคราะห์เอนไซม์ในการสังเคราะห์ acetyl-coA จากอะซิเตท พบกิจกรรมของเอนไซม์ acetyl-coA synthetase เพื่อนำเอาอะซิเตทเข้าสู่ วัฏจักร Tricaboxylic acid เช่นเดียวกับวัฏจักร Glyoxylate ซึ่งแบคทีเรียเจริญอย่างรวดเร็วบนกรดน้ำส้ม หลังจากเอทานอลในอาหารถูกใช้หมด ผลการศึกษาการเจริญและข้อมูลด้านเอนไซม์แสดงว่าเซลล์จาก growth phase แรกมีลักษณะทางสรีระวิทยาแตกต่างจาก growth phase ที่สอง

2.3 การแพร่กระจายของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชู

การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูเริ่มมาจากตัวอย่างที่ได้รับจากแหล่งที่มีอุณหภูมิปานกลาง เช่น ยุโรป อเมริกาและญี่ปุ่น ต่อมามีรายงานว่าพบตัวอย่างในบริเวณเขตร้อน เช่น อินโดนีเซียและประเทศไทย (Lisdiyanti *et al.,* 2001) แบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูมีอย่างแพร่หลาย เช่น ในแหล่งที่มีน้ำตาล, มีสภาวะเป็นกรด และในที่มีเอทานอล นอกจากนี้แบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูสามารถพบในผลไม้และดอกไม้หลายชนิด (Swing, 1992) *Gluconobacter* มีผลทำให้แอปเปิลและถั่วเน่าแต่ไม่เป็นเชื้อก่อโรคในคนและสัตว์ (De Ley and Swing, 1984) นอกจากนี้ สายพันธุ์ที่เป็น endophytic N_2-fixing คือ *Acetobacter diazotrophicus* คัดแยกได้จาก เนื้อเยื่อของต้นอ้อย เช่น ราก ท่อน้ำท่ออาหาร (Cavalcant และ Doberiner, 1988) และต้นสับปะรดในเม็กซิโก, สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้จากต้นกาแฟ (*Gluconacetobacter johannae* and *G. azotocaptans*) (Fuentes-Ramiree et al,. 2001) ในรัฐควีนแลนด์และตอนเหนือของรัฐนิวเซาว์เวลล์ ประเทศออสเตรเลีย พบเชื้อ *Gluconacetobacter sacchari* จากเปลือกของต้นอ้อย (Franke. 1999)

ในอินโดนีเซีย, สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูได้จาก ผลไม้ ดอกไม้และอาหารหมัก ซึ่งจำแนกเป็น *Acetobacter, Gluconacetobacter* และ *Gluconobacter* (Yamada *et al.,* 1999) Lisdiyanti *et al.,* (2000) ได้เสนอ 2 สายพันธุ์ใหม่ของ *Acetobacter* คือ *A. indonesiensis* ซึ่งแยกได้จากผลไม้และดอกไม้ และ *A. tropicalis* ซึ่งคัดแยกได้จากมะพร้าว (coco nucifera)ในปี 2001, Lisdiyanti *et al.,* ได้จำแนกสายพันธุ์ของ *Acetobacter* จากตัวอย่างผลไม้ ดอกไม้และอาหารหมักทั่วไปที่เก็บในประเทศอินโดนีเซีย และได้เสนอสายพันธุ์

Acetobacter syxysii, A. cibinogensis และ *A. orientalis* นอกจากนี้ยังเสนอ *Asaia bogorensis* ซึ่งแยกได้จากดอกไม้ ต้นกล้วยไม้ (plumbago) และข้าวเหนียวหมักจากประเทศอินโดนีเซีย(Yamada *et al.,* 2000)

สำหรับในประเทศไทย, ได้มีการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูที่ทนอุณหภูมิสูง จากตัวอย่างผลไม้และดอกไม้หลายๆ ชนิด (Theeragool *et al.,* 1996 : Moonmangmee *et al.,* 2000) ซึ่งบางตัวอย่างจำแนกเป็น *Acetobacter, Gluconobacter* นอกจากนี้ยังพบสายพันธุ์ใหม่ ได้แก่ *Asaia siamensis* ซึ่งแยกจากดอกไม้ที่เก็บในประเทศไทย (Katsura *et al.,* 2000) แบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูยังสามารถแยกได้จากน้ำส้มสายชู ไวน์ สาเก น้ำผลไม้ปั่น เบียร์ และเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (Swing, 1992) *Acetobacter polyoxogenes* เป็นสายพันธุ์แรกของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูซึ่งแยกได้จากการผลิตน้ำส้มสายชูที่มีกรดสูง (Entani *et al.,* 1985) ต่อมา (Sievers *et al.,* 1992) อธิบายว่า *Acetobacter europaeus* เป็นแบคทีเรียที่ผลิตน้ำส้มสายชูที่ใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม การหมักน้ำส้มสายชูในยุโรป สายพันธุ์ *Acetobacter intermedius* แยกได้จากการหมักน้ำส้มสายชู (อุตสาหกรรมการทำเบียร์ในกัมพูชา) และสายพันธุ์ *Gluconacetobacter entanii* แยกได้จากการหมักน้ำส้มสายชูที่กรดสูง (Boesch *at al.,* 1998 และ Schuller *et al.,* 2000)

จากการคัดแยกแบคทีเรียทั้งหมด 331 strains จากเอเชียตะวันออก-เอเชียใต้ ลักษณะของแบคทีเรียที่พบคือ แกรมลบ รูปร่างกลม สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส ออกซิเดสเป็นลบ ในอาหารที่มีส่วนประกอบแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าแบคทีเรียมีการสร้างบริเวณใสรอบ ๆ อาหารเลี้ยงเชื้อทุก strains แบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารที่มีความกรด- ด่าง 3.5 พบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดดังนี้ *Gluconobacter* 67 strains, *Gluconacetobacter* 20 strains, *Asaia* 67 strains, *Kozakia* 4 strains และ *Frateuria* 16 strains แต่ไม่พบสายพันธุ์ของ *Acidomonas* (Yamada *et al.,* 2003)

แต่อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาและค้นพบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ๆ อยู่ตลอดเวลา ทั้งในประเทศในเขตทวีปยุโรป และเอเชีย หรือทวีปอื่นๆ อย่างต่อเนื่อง ตามที่ได้นำเสนอไปแล้วเบื้องต้น