



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ *Paenibacillus* spp. ที่ทนกรดอะซิติกความเข้มข้นสูงเพื่อ

กระบวนการผลิตกรดอะซิติก

Novel strain of high acetic acid tolerant strain of *Paenibacillus* spp.

for acetification process

นายวราวุฒิ กรูสง

นางสาววิรามศรี ศรีพจนารถ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2562

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ *Paenibacillus* spp. ที่ทนกรดอะซิติกความเข้มข้นสูง
เพื่อกระบวนการผลิตกรดอะซิติก

แหล่งเงิน เงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 80,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2562

หัวหน้าโครงการ วราวุฒิ ครูส่ง และผู้ร่วมโครงการวิจัย วิรามศรี ศรีพจนารถ สาขาเทคโนโลยีการหมัก
คณะอุตสาหกรรมเกษตร

บทคัดย่อ

แบคทีเรียที่สร้างกรดที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียในระหว่างการหมักถูกคัดแยกออกมาจากขั้นตอนการย่อยข้าวให้เป็นน้ำตาลของการทำไวน์ข้าวไร้โดยเน้นในกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ซึ่งพบว่า สายพันธุ์ P8 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดได้สูงที่สุดทั้งภายใต้สภาพความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่สูงและในระหว่างการหมักกรดอะซิติก และจากการวิเคราะห์ทางด้าน Phylogenetic ด้วยหลักการ 16S rRNA gene sequences แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์ P8 นี้คือแบคทีเรียจีนัส *Paenibacillus* โดยมีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Paenibacillus azoreducens* ถึง 99.855 %

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากเชื้อ *P. azoreducens* ด้วย Gas chromatography-mass spectrometry ยืนยันได้ว่าเชื้อ *P. azoreducens* สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ ต่อมาเมื่อนำไปหมักในสภาพกึ่งต่อเนื่องจำนวน 9 รอบพบว่า เชื้อ *P. azoreducens* ผลิตกรดอะซิติกได้ในช่วงระหว่าง 69 ± 0.5 ถึง 79 ± 0.2 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการสร้างกรดโดยเฉลี่ยเท่ากับ 5.7 กรัมต่อลิตรต่อสัปดาห์ และมีค่า bio-transformation yield เท่ากับ 90.1% อีกทั้งยังไม่พบทั้งการสร้างวุ้นเซลลูโลสและปฏิกิริยา over-oxidation ของกรดอะซิติกอีกด้วย

จากการวิเคราะห์สารระเหยที่ได้จากการหมัก พบว่า ในสารระเหยที่ตรวจพบในน้ำหมักที่ผลิตจากเชื้อ *P. azoreducens* จำนวน 40 ชนิด มีจำนวน 20 ชนิด ที่ตรวจพบเช่นเดียวกันกับในน้ำหมักที่ผลิตจากเชื้อ *Acetobacter aceti* WK (ซึ่งมีการสร้างสารระเหยจำนวน 37 ชนิด) โดยมีสารระเหยจำนวน 8 ชนิดที่จัดเป็นสารระเหยหลักที่พบในเชื้อทั้งสองชนิด

ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนที่แยกได้นี้ก่อให้เกิดทั้งผลดีและผลเสียต่อการหมัก และยังมีสมบัติในการสร้างกรดอะซิติกชีวภาพ ทั้งนี้เชื้อ *P. azoreducens* นี้อาจจะเป็นประโยชน์ในการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพในอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

คำสำคัญ : *Paenibacillus azoreducens*, กรดอะซิติกชีวภาพ, การสร้างกรดอะซิติก, ความเข้มข้นกรดอะซิติกสูง, กึ่งต่อเนื่อง, สายพันธุ์ที่ทนกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Novel strain of high acetic acid tolerant strain of *Paenibacillus* spp. for acetification process

Researcher: Warawut Krusong and Wiramsri Sriphochanat

Faculty: Agro-Industry Division: Fermentation Technology

ABSTRACT

Acid producing bacteria which cause spoilage of alcoholic beverages during the fermentation process, were isolated from saccharified upland rice during rice wine processing. An endospore-forming bacterium designated as strain P8, was the highest acid producing strain both under high initial acetic acid concentration and during subsequent acetification processing.

Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that strain P8 was affiliated to the genus *Paenibacillus*, most closely related to *Paenibacillus azoreducens* with 99.855 % similarity. Analysis of samples, using gas chromatography-mass spectrometry, confirmed that acetic acid could be produced by *P. azoreducens*. When the effects of *P. azoreducens* in semi-continuous production was examined, it was shown that acetic acid in the range of 69 ± 0.5 to 79 ± 0.2 g L⁻¹ was produced during nine consecutive cycles with the average acetification rate at 5.7 g L⁻¹ week⁻¹ and bio-transformation yield at 90.1%. In addition, both no cellulosic film formation and no over-oxidation of acetic acid were observed.

Among 40 volatile compounds associated with the fermentation process, 20 were similar to those found in vinegar produced by *Acetobacter aceti* WK (37 total volatile components) of which eight were the main components that were common to vinegar product by both *P. azoreducens* and *A. aceti*.

Our study showed that this contaminating organism could have positive as well as negative effects and bio-acetic acid production could be successfully produced from *P. azoreducens*, which may be a useful bioproduct for future commercial production.

Keywords : *Paenibacillus azoreducens*, bio-acetic acid, acetification, high acetic acid concentration, semi-continuous, acid-tolerant strain

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 (รหัสโครงการ 2562-01-07001) ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ อีกทั้งขอขอบคุณมูลนิธิโทเร เพื่อการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ ประเทศไทย (Thailand Toray Science Foundation) ที่ได้มอบทุนสนับสนุนการวิจัยเพิ่มเติมจนทำให้งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	6
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการหมักในการผลิตกรดอะซิติก.....	6
3.2 การคัดเลือกแบคทีเรีย Spore former-acid producing bacteria จากวัตถุดิบข้าวที่ผ่านย่อย.....	6
3.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดอะซิติกได้ในสภาพกรดอะซิติกสูง.....	7
3.4 16S sequencing และ phylogenetic analysis ของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรดที่สามารถผลิตกรดอะซิติกสูงสุด.....	7
3.5 การปรับสภาพเชื้อแบคทีเรีย <i>Paenibacillus</i> ในสภาพที่มีกรดอะซิติกเริ่มต้นสูง.....	7
3.6 การเปรียบเทียบการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพ การสร้างสารระเหย และสมบัติ Over-oxidation ของเชื้อแบคทีเรีย <i>Paenibacillus</i> ที่ผ่านการคัดเลือกและเชื้อแบคทีเรียอะซิติก <i>Acetobacter aceti</i> ภายใต้กระบวนการหมักแบบ High initial acetic acid concentration (HAA).....	8

กสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ิว่าการณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.7 การผลิตกรดอะซิติกชีวภาพด้วยระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องด้วยเชื้อ <i>Paenibacillus</i>	9
3.8 วิเคราะห์วิเคราะห์ Analytical methods	9
3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	11
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรีย Spore former-acid producing bacteria จากวัตถุดิบข้าวที่ผ่านย่อย	11
4.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดอะซิติกได้ในสภาพกรดอะซิติกสูง	13
4.3 16S sequencing และ phylogenetic analysis ของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และ สร้างกรดที่สามารถผลิตกรดอะซิติกสูงสุด	14
4.4 การปรับสภาพเชื้อแบคทีเรีย <i>Paenibacillus azoreducens</i> ในสภาพที่มีกรดอะซิติกเริ่มต้นสูง	15
4.5 การเปรียบเทียบการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพ การสร้างสารระเหย และสมบัติ Over-oxidation ของเชื้อแบคทีเรีย <i>Paenibacillus</i> ที่ผ่านการคัดเลือกและเชื้อ แบคทีเรียอะซิติก <i>Acetobacter aceti</i> ภายใต้กระบวนการหมักแบบ High initial acetic acid concentration (HAA)	15
4.6 การผลิตกรดอะซิติกชีวภาพด้วยระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องด้วยเชื้อ <i>Paenibacillus azoreducens</i>	21
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	22
5.1 สรุปผลการวิจัย	22
5.2 ข้อเสนอแนะ	25
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย	26
6.1 สรุปผลงานวิจัย	26
6.2 สรุปผลผลิตงานวิจัย	26
บรรณานุกรม	27
ภาคผนวก	33
ภาคผนวก ก สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย	33
ประวัตินักวิจัย	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรดที่ปนเปื้อนจากข้าวที่ผ่านขั้นตอนการย่อยให้เป็นน้ำตาล.....	11
4.2 สารระเหย (volatile components) ของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อ <i>Paenibacillus azoreducens</i> เมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS.....	17
4.3 สารระเหย (volatile components) ของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อ <i>Acetobacter aceti</i> เมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS.....	19
4.4 ผลการผลิตกรดอะซิติกด้วยระบบกึ่งต่อเนื่องภายใต้กระบวนการ high initial acetic acid concentration (HAA,) จากเชื้อ <i>Paenibacillus azoreducens</i> ที่อุณหภูมิ 30+1 องศาเซลเซียส (ความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร).....	21



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1 ลักษณะตัวอย่างข้าวที่ผ่านการย่อยเพื่อใช้ในการแยกแบคทีเรียที่ปนเปื้อน.....	11
4.2 ลักษณะของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร <i>Paenibacillus</i> -basal medium ที่เติม แคลเซียมคาร์บอเนต : (a) โคโลนีสองลักษณะที่สามารถกรดได้; (b) โคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรด.....	13
4.3 ปริมาณกรดที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 15 เชื้อ รหัส P1-P15 ในการหมักเพื่อผลิตกรดในสภาพ High initial acetic acid concentration ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน.....	13
4.4 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส P8 ที่สามารถผลิตกรดได้สูงสุด.....	14
4.5 ลักษณะการปรับเชื้อ <i>Paenibacillus azoreducens</i> ภายใต้อสภาพ High initial acetic acid concentration ที่ความเข้มข้นโดยรวมเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง.....	15
4.6 การผลิตกรดอะซิติกด้วยกระบวนการ high initial acetic acid concentration ด้วยเชื้อแบคทีเรีย: (a) <i>Paenibacillus azoreducens</i> ; (b) <i>Acetobacter aceti</i>	16

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมากในธุรกิจทาง Microbial biotechnology คือ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และถึงหมักที่ได้ การออกแบบเพื่อรองรับการผลิตผลิตภัณฑ์จากสายพันธุ์ของจุลินทรีย์นั้น ในช่วงทศวรรษนี้พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Paenibacillus* ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมเพราะมีโครงสร้างสปอร์ภายในเซลล์ พร้อมทั้งมีสมบัติในการผลิตสารต่างๆ หลากหลายชนิด ดังเช่น (1) phytohormone indole-3-acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่สำคัญ (2) antimicrobial และ insecticides (3) *Paenibacillus*-derived antimicrobials ที่มีการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ รวมถึง polymyxins และ fusaricidins (4) exo-polysaccharide (EPS) และ (5) เอนไซม์ เช่น amylases, cellulases, hemicellulases, lipases, pectinases, oxygenases, dehydrogenases, lignin-modifying enzymes และ mutanases ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาแบคทีเรียสายพันธุ์นี้อย่างจริงจัง ประกอบกับหัวหน้าโครงการได้พัฒนาถังหมัก internal Venturi injector bioreactor (อนุสิทธิบัตรในชื่อเรื่อง “กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ ตามคำขอเลขที่ 1403001128 ขึ้นเมื่อวันที่ 18 กันยายน 2557 เลขที่ทรัพย์สินทางปัญญา 12907 วันที่ออกให้ 26 กรกฎาคม 2560 วันหมดอายุ 17 กันยายน 2563 ทั้งนี้แต่เดิมได้ยื่นขอสิทธิบัตรตามคำขอเลขที่ 0801005225 ขึ้นเมื่อวันที่ 13 ตุลาคม 2551 และมีการขอใช้สิทธิประโยชน์ จำนวน 5 โรงงาน ดังแสดงในสัญญาเลขที่ LA 53/01 ลงวันที่ 4 มกราคม พ.ศ. 2553; เลขที่ LA 54/01 ลงวันที่ 23 กันยายน พ.ศ. 2554; LA 55/01 ลงวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2555; เลขที่ LA 60/02 ลงวันที่ 19 เมษายน พ.ศ. 2560; และเลขที่ LA 62/01 ลงวันที่ 29 มีนาคม พ.ศ. 2562) สามารถรองรับการทำงานของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศซึ่งเหมาะสมกับแบคทีเรีย *Paenibacillus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เจริญในสภาพที่มีการให้อากาศได้ อนึ่งการใช้ประโยชน์เบื้องต้น คือ การพัฒนาปรับสภาพให้เชื้อ *Paenibacillus* ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการทนกรดอะซิติกสูงได้เพื่อพัฒนาเป็นหัวเชื้อที่สามารถผลิตกรดอะซิติกและเป็นก้าวแรกในเชิงการค้าได้ต่อไป ซึ่งจะทำให้เกิดเอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้ นอกจากนี้แล้วยังมีเป้าหมายในอนาคตเพื่อทำการพัฒนาปรับปรุงหัวเชื้อ *Paenibacillus* นี้ ในมิติของการผลิตผลิตภัณฑ์ตามคุณประโยชน์ของเชื้อเพื่อเป็นหัวใจสำคัญต่อ sustainable agriculture และ industrial biotechnology

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* จากข้าว

1.2.2 เพื่อปรับสภาพเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* ให้ทนกรดอะซิติกในความเข้มข้นที่สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.3. เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* ในสภาพการหมักแบบ High initial acetic acid concentration process

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตของโครงการครอบคลุมการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* จากวัตถุดิบข้าว เนื่องจากในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมักได้มุ่งเน้นการศึกษาวิจัยน้ำส้มสายชูจากข้าวมาเป็นเวลามากกว่า 5 ปี จึงมั่นใจว่าจะสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการจากข้าวได้ จากนั้นจึงนำเชื้อที่คัดแยกได้มาผ่านขั้นตอนการปรับสภาพให้เชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* ที่คัดแยกได้มาผ่านการปรับสภาพภายใต้สภาพความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่สูง (4.5 5.5 และ 6.5% ซึ่งเป็นสภาพที่แบคทีเรียทั่วไปถูกทำลายยกเว้นเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรียอะซิติก *Acetobacter aceti* WK และ *A. pasteurianus* NK ซึ่งเป็นเชื้อที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ได้ใช้ในการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพอยู่แล้ว) และที่อุณหภูมิสูง (40 องศาเซลเซียส) จากนั้นเมื่อได้เชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วจึงนำศึกษาความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกในระบบ High initial acetic acid concentration process (Krusong *et al.*, 2015) ในถังหมัก internal Venturi injector bioreactor ต้นแบบขนาด 100 ลิตร เพื่อพัฒนาเป็นกระบวนการผลิตกรดอะซิติกในลักษณะ Novel process ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus*

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ดำเนินการวิจัยในห้องปฏิบัติการโดยแบ่งเป็นขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* การคัดแยกให้บริสุทธิ์ การคัดแยกเชื้อด้วยกิจกรรมการสร้างกรดอะซิติก และการนำเชื้อที่คัดแยกว่ามีกิจกรรมการสร้างกรดอะซิติกได้ดีมาทดลองหาประสิทธิภาพในถังหมัก internal Venturi injector bioreactor ต้นแบบขนาด 100 ลิตร ซึ่งจะทำให้สามารถมั่นใจได้ว่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนกรดอะซิติกได้สูงซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เพื่อผลิตกรดอะซิติกทางชีวภาพ (Bio-acetic acid) แทนเชื้อแบคทีเรียอะซิติก (Acetic acid bacteria) เดิมได้ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Paenibacillus* นี้แต่เดิมถูกจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย *Bacillus* และจากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ถูกจัดให้เป็น *B. subtilis* ซึ่งถูกแยกจากธรรมชาติได้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1872 ทั้งนี้แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* นี้มีลักษณะเซลล์เป็นรูปท่อน (rod-shaped) เจริญได้ในสภาพที่มีอากาศ (aerobe) หรือ ในสภาพที่มีหรือไม่มีอากาศก็ได้ (facultative anaerobe) และมีสปอร์ภายในเซลล์ (Zeigler, 2013) อย่างไรก็ตามเมื่อมีการใช้ 16S rRNA gene sequences ในปี ค.ศ. 1991 ได้จำแนก 51 สายพันธุ์ยังเป็นชื่อ *Bacillus* (Priest *et al.*, 1988; Ash *et al.*, 1991) และต่อมาได้มีการใช้ Phylogenetic analyze ได้มีการแบ่งกลุ่มชื่อ *Bacillus* ออกเป็น 5 กลุ่มหลักและหนึ่งในนั้นถูกตั้งเป็นสายพันธุ์ที่เรียกว่า *Paenibacillus* ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1993 เป็นต้นมา โดยคำว่า Paene มาจากภาษาลาตินแปลว่า “เกือบจะ” ซึ่งในที่นี้หมายความว่า เชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* นี้เกือบจะเป็นชื่อแบคทีเรีย *Bacillus* นั่นเอง (Ash *et al.*, 1993) ในปัจจุบันแบคทีเรีย *Paenibacillus* ถูกจัดเป็นหนึ่งในแปดสายพันธุ์ของกลุ่ม Family Paenibacillaceae

ปกติแล้วแบคทีเรีย *Paenibacillus* สามารถถูกแยกออกมาได้จากสภาพแวดล้อมได้หลากหลายและยังมีสายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับคน สัตว์ พืช และสิ่งแวดลอม อย่างไรก็ตามดินเป็นสภาพแวดล้อมหลักที่จะเป็นแหล่งของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ ดังเช่นที่พบในรากพืชจึงพบว่าเป็น Rhizobacteria promote plant growth ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์ในด้านเกษตรกรรมได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการคัดเลือกจากข้าวโดยเฉพาะตัวอย่างที่ได้รับจากการย่อยข้าวให้เป็นน้ำตาลในช่วงการเตรียมไวน์ข้าวในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก

ในปัจจุบันแบคทีเรียสายพันธุ์ *Paenibacillus* ได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากมีสมบัติในการผลิตสารต่างๆหลากหลาย ชนิด ประกอบด้วย

(1) แบคทีเรีย *Paenibacillus* มีผลต่อการเจริญของพืช เนื่องจากสร้าง indole-3-acetic acid (IAA; ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่สำคัญ และ auxin phytohormone โดยในพืชหลายกลุ่ม เช่น ข้าวโพด (Sheera and Usharani, 2013) และข้าว (de Souza *et al.*, 2014) ดังนั้นจึงได้มีผู้สนใจใช้แบคทีเรีย *Paenibacillus* เป็น Biofertilizer ในระดับอุตสาหกรรม

(2) แบคทีเรีย *Paenibacillus* มีผลทางด้าน biocontrol เนื่องจากมีผลต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในพืชรวมถึงแมลงที่กินพืช (โดยสามารถทำลายตัวอ่อนของแมลงรวมถึงตัวทอง) จึงมีการประยุกต์ใช้ในการปลูกพืชต่างๆ เช่น แตงกวา ถั่ว ถั่วเหลือง พริกไทย ดังนั้นจึงได้มีการใช้เป็นสารกำจัดเชื้อรา (fungicides) และสารฆ่าแมลง (insecticides) (Singh *et al.*, 2009) ในกรณีของสารฆ่าแมลง เนื่องจากแบคทีเรีย *Paenibacillus* สร้างเอนไซม์ chitinase ที่สามารถย่อยสลายไคติน (chitin) ที่เป็นองค์ประกอบหลักของ exoskeleton ของแมลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) แบคทีเรีย *Paenibacillus* สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobials) โดยสารเหล่านั้นประกอบด้วย เปปไทด์ (peptide) เอนไซม์ และ สารอินทรีย์ระเหย (volatile organic compounds; VOCs) ทั้งนี้ Antimicrobial peptide ถูกใช้เป็น Bio-control ในการเกษตรกรรม ในขณะที่ Purified peptide รวมถึง Synthesized peptide ใช้ในวงการแพทย์ในลักษณะของ Lantibiotics (Huang and Yousef, 2015) และ Pediocins (Abriouel *et al.*, 2011) ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ bacteriocins ซึ่งจัดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์

(4) แบคทีเรีย *Paenibacillus* สามารถสร้าง exo-polysacchride (EPS) (Liang and Wang, 2015) ที่เป็น โพลีเมอร์ที่ละลายน้ำได้ โดยสาร EPS นี้มีสมบัติเป็น antioxidant และ anti-tumor จึงมีแนวโน้มสูงที่จะมีการประยุกต์ใช้ในการแพทย์ ทั้งนี้จากการศึกษาของ Liu *et al.* (2012) รายงานว่า EPS ช่วยลด oxidative stress ที่ตับของหนูทดลองได้และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่กระเพาะในระดับหนูทดลองได้

(5) แบคทีเรีย *Paenibacillus* สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลากหลายชนิดก่อให้เกิดประโยชน์ในกระบวนการผลิตต่างๆ ทั้งผงซักฟอก (detergents) อาหาร สิ่งทอ กระดาษ และเชื้อเพลิงชีวภาพ โดยเอนไซม์เหล่านั้นประกอบด้วย amylases, cellulases, hemicellulases, lipases, pectinases และ lignin-modifying enzymes (Saxena *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2016)

(6) แบคทีเรีย *Paenibacillus* มีผลทางด้าน Bioremediation ในการกำจัดหรือช่วยในการย่อยสลายสิ่งสกปรกที่เป็นสารอินทรีย์โดยช่วยให้เกิดการตกตะกอน (biofloculants) หรือ ด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อ ทั้งนี้มีรายงานว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* สามารถย่อยสลายสีที่ใช้ในธุรกิจสิ่งทอ (Ramya *et al.*, 2008) polyvinyl alcohol ที่ใช้เคลือบสิ่งทอหรือ เส้นใย (Choi *et al.*, 2004) รวมถึงสารพิษจากธุรกิจเยื่อกระดาษ (Raj *et al.*, 2014)

ถังหมัก (Fermenter หรือ bioreactor) ในระบบกรหมักแบบให้อากาศที่จำเป็นต่อการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพจำเป็นต้องได้รับการออกแบบให้มี “การกระจายอากาศเข้าสู่หมักที่ดีในปริมาณสูงและมีความสม่ำเสมอที่มีประสิทธิภาพ” โดยต้องคำนึงถึงค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำหมัก (Dissolved oxygen) เป็นสำคัญ ทั้งนี้หัวหน้าคณะวิจัยได้ออกแบบถังหมักที่มีการให้อากาศอย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ได้ใช้ใบพัด (ถังหมัก internal Venturi injector bioreactor ตามอนุสิทธิบัตรในชื่อเรื่อง “กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ ตามคำขอเลขที่ 1403001128 ยื่นเมื่อวันที่ 18 กันยายน 2557 เลขที่ทรัพย์สินทางปัญญา 12907 วันที่ออกให้ 26 กรกฎาคม 2560 วันหมดอายุ 17 กันยายน 2563 ทั้งนี้แต่เดิมได้ยื่นขอสิทธิบัตรตามคำขอเลขที่ 0801005225 ยื่นเมื่อวันที่ 13 ตุลาคม 2551) ทั้งนี้ดังแสดงในรายงานของวราวุฒิ ครุส่ง และคณะ (2553) อนึ่งในการศึกษานี้จะใช้ถังหมักที่กล่าวถึงขนาด 100 ลิตร (ซึ่งเป็นถังต้นแบบ) เพื่อใช้ศึกษาการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพจากแบคทีเรีย *Paenibacillus* ที่คัดเลือกและผ่านการปรับสภาพให้สามารถทนกรดอะซิติกเริ่มต้นที่ความเข้มข้นสูงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Yamada and Yukphan (2008) รายงานว่า การผลิตกรดอะซิติกชีวภาพนั้น ตามปกติแล้วกรดอะซิติกชีวภาพจะผลิตจากแบคทีเรียอะซิติกซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศและอยู่ในกลุ่มของ Alphaproteobacteria โดยเฉพาะในกลุ่มของ *Acetobacter*, *Gluconobacter* และ *Gluconacetobacter* ทั้งนี้การผลิตกรดอะซิติกดังกล่าวจากเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเอธานอลด้วยเอนไซม์ที่อยู่ในเมมเบรนของตัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติก

Marwoto *et al.* (2004) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* สามารถทำการสร้างกรดอะซิติกได้ในระหว่างการใช้น้ำตาลไซโลส (xylose consumption) มากกว่าน้ำตาลกลูโคส จากรายงานนี้แสดงให้เห็นว่ามีแนวโน้มที่จะผลิตกรดอะซิติกชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* ได้

Krusong *et al.* (2014, 2015) รายงานถึงการพัฒนาระบวนการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพที่ใช้ความเข้มข้นของกรดอะซิติกเริ่มต้นสูงที่เรียกว่า **High initial acetic acid concentration acetification process** โดยอาศัยการปรับสภาพน้ำหมักเริ่มต้นให้มีสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูง (อย่างน้อยเท่ากับ 4.5%) และปรับให้มีความเข้มข้นของเอธานอลเท่ากับ 3.5% ซึ่งส่งผลให้ความเข้มข้นโดยรวมในน้ำหมักเริ่มต้นที่เรียกว่า “ความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration, TC)” เท่ากับ 8% ในการผลิตกรดอะซิติกด้วยแบคทีเรียอะซิติกทำให้ได้ผลผลิตกรดอะซิติกสูง ทั้งนี้เป้าหมายของกระบวนการผลิตที่ใช้ TC ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงนั้นเพื่อทำการปรับสภาพหัวเชื้อให้สามารถสร้างผลผลิตกรดอะซิติกสูงตามไปด้วย โดยหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติกจะต้องสามารถอยู่รอดและเจริญในสารละลายกรดสูงได้ด้วย นอกจากนี้แล้ว Krusong *et al.* (2014, 2015) ยังรายงานถึงสภาพความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงนี้ส่งผลต่ออัตราการผลิตกรดอะซิติก (Acetification rate; ETA) ของหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติก โดยหัวเชื้อที่ผ่านการปรับสายพันธุ์ให้ทนกรดสูง (High acid tolerant AAB strain) สามารถให้ ETA ในระดับที่สูงกว่า 2.0 % (หรือ 20 กรัมต่อลิตร) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ de Ory *et al.* (2004) ที่รายงานว่าแบคทีเรียอะซิติกไม่สามารถทนความเข้มข้นของกรดอะซิติกเกิน 2% ได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการหมักในการผลิตกรดอะซิติก

เชื้อแบคทีเรียอะซิติก *Acetobacter aceti* WK- เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนกรดอะซิติกได้สูง (high acid-tolerant acetic acid bacteria) เชื้อนี้ได้ผ่านการแยกและคัดเลือกจากสับปะรดมาเป็นเวลามากกว่า 10 ปี โดยผ่านการปรับสภาพให้ทนกรดอะซิติกมากกว่า 10 ปี (ที่ 30+1 องศาเซลเซียส) ด้วยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มความเข้มข้นกรดอะซิติกจาก 10 กรัมต่อลิตร เป็น 25+1, 45+1 และ 65+1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 ปี (Krusong and Tantratian, 2014)

หัวเชื้อของแบคทีเรียอะซิติกเตรียมโดยการเลี้ยงใน Complex medium (กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร; Krusong et al., 2007): กลูโคส 50, ยีสต์สกัด 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 และ $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 ภายใต้การให้อากาศที่ 4.5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ที่ 30+1 องศาเซลเซียส (Krusong et al., 2007).

น้ำส้มสายชูจากข้าวไร่ (Upland rice vinegar) ที่มีกรดอะซิติก 8% ได้รับจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. น้ำส้มสายชูนี้ใช้เพื่อปรับปริมาณกรดอะซิติกในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูจากเชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* และแบคทีเรียที่มีสปอร์และสร้างกรด (spore former-acid producing bacteria) ที่คัดเลือกได้

ไวน์ข้าวไร่ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ 90+0.2 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรด 1.8+0.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งใช้เพื่อปรับปริมาณแอลกอฮอล์ในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู

สภาวะการหมักในการผลิตกรดอะซิติก (Acetification condition) – อาศัยกระบวนการหมักแบบ High initial acetic acid concentration (HAA_i) (Krusong et al., 2014) โดยมีการปรับความเข้มข้นเริ่มต้นในน้ำหมักให้เท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร (ดังมีรายละเอียดที่กล่าวถึงแล้วในข้อ 3.1) และเติม complex nutrients (ส่วนประกอบกล่าวถึงแล้วข้างต้น) ทั้งนี้จากผลด้านการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial effect) ของกรดอะซิติกทำให้สภาวะการหมักนี้ไม่จำเป็นต้องผ่านการฆ่าเชื้อ

3.2 การคัดเลือกแบคทีเรีย Spore former-acid producing bacteria จากวัตถุดิบข้าวที่ผ่านย่อย

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรด (spore former-acid producing bacteria) จากตัวอย่างข้าวในขั้นตอนการย่อยข้าวให้เป็นน้ำตาลที่ปนเปื้อนหรือเน่าเสียจำนวน 30 ตัวอย่าง นำตัวอย่างข้าวมาทำการเจือจางด้วย 1% peptone water ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นนำมา Pour plate ลงในอาหาร sterile *Paenibacillus*-basal agar medium (กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร: กลูโคส 20 ยีสต์สกัด 5 ทริปโตน 5 $(NH_4)_2HPO_4$ 7, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25, $CaCO_3$ 10 และ

วัน 15 (ดัดแปลงจาก Nakashimada et al., 2004). ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ติดตามผลเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตโคโลนีที่เกิด clear zone บนอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนที่จะนำโคโลนีดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการ Streak ลงบนอาหาร *Paenibacillus*-basal medium agar ทำลักษณะเดียวกันอย่างน้อย 3 รอบ จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ทั้งนี้เชื้อทุกไอโซเลทที่สามารถสร้างกรดได้จะต้องนำมาขย้อมสีเพื่อคูลสปอร์และนำเชื้อคัดเลือกได้นั้นเก็บไว้ใน *Paenibacillus*-basal medium agar agar slant ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดอะซิติกได้ในสภาพกรดอะซิติกสูง

นำไอโซเลทของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรด จากข้อ 3.2 มาเลี้ยงในน้ำหมักที่ปรับสารอาหารด้วย complex medium (ดังที่กล่าวถึงข้างต้น) และปรับให้มีความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร (ดังมีรายละเอียดที่กล่าวถึงแล้วในข้อ 3.1) ในขวดออสตินขนาด 1 ลิตร ปริมาตรที่ใช้เท่ากับ 500 มล. (Krusong et al., 2014, 2015) พร้อมทั้งต่อระบบการให้อากาศจากปั๊มให้อากาศในอัตรา 4 ลิตรต่อนาที ทำการคัดเลือกเชื้อไอโซเลทที่ให้ผลผลิตกรดอะซิติกสูงสุด จากขณะเดียวกันทำการวิเคราะห์สายพันธุ์ที่ชัดเจนด้วย phylogenetic analysis - 16S DNA sequencing

3.4 16S sequencing และ phylogenetic analysis ของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรดที่สามารถผลิตกรดอะซิติกสูงสุด

ในการตรวจหา phylogenetic position ของไอโซเลทของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรดอะซิติกสูงสุด จากข้อ 3.3 อาศัย 16S rRNA sequencing ทั้งนี้ขั้นตอน DNA extraction, amplification และ sequencing ของ 16S rRNA gene ดำเนินการ โดยอาศัยวิธีการของ Macrogen Inc. company

Sequence ถูกตัดแต่งแยกเอาเบสที่มีคุณภาพต่ำ (low quality bases) ออกไปด้วย Phred v 0.071220.c และทำการล้อมด้วย Phrap v 1.090518 (Ewing and Green, 1998) ทั้งนี้ dataset ถูกโครงสร้างขึ้นอาศัยการดาวน์โหลดของ 20 16S sequences ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Paenibacillus* จาก NCBI 16S rRNA databases (ที่เก็บรวบรวมสายพันธุ์ที่จำแนกได้ในเมทริกซ์อาหาร ทั้งนี้ 16S sequences ถูกดึงออกมาด้วย Muscle v3.8.31 (Edgar, 2004) แล้วส่งต่อไปยัง MegaX (Kumar et al., 2018) และตัดแต่งเพื่อให้ได้ sequences ที่มีความยาวเท่ากันและถูกใช้ไปสร้างโอกาสสูงสุดของ phylogenetic tree ซึ่งประยุกต์ตาม Tamura-Nei evolutionary model (Tamura and Nei, 1993) โดยถูกคำนวณเป็น 1000 ซ้ำ ทั้งนี้โดยเบื้องต้น พบว่า เชื้อไอโซเลทที่สร้างสปอร์และสร้างกรดอะซิติกสูง คือ สายพันธุ์ *Paenibacillus*

3.5 การปรับสภาพเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* ในสภาพที่มีกรดอะซิติกเริ่มต้นสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยธรรมชาติของการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพให้มีปริมาณกรดอะซิติกสูงนั้น จำเป็นต้องทำให้หัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดอะซิติกสามารถปรับสภาพให้เข้ากับสภาพที่มีความเข้มข้นกรดอะซิติกสูงได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเริ่มต้นตั้งแต่การปรับสภาพหัวเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ให้เข้ากับไวน์ข้าวไร้ โดยเริ่มจากนำไวน์ข้าวไร้ที่ปรับให้มีความเข้มข้นโดยรวม (total concentration; TC) เท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร (ดังมีรายละเอียดที่กล่าวถึงแล้วในข้อ 3.1) ไล่ลงไปในช่วงอุณหภูมิ 500 มล. ที่มีการต่อท่อให้อากาศเข้าไปในอัตรา 4 ลิตรต่อนาที ทำการถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.4 ปรับสภาพที่อุณหภูมิห้อง และสุ่มตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์และค่าความเป็นกรด (acidity) ทุกวัน อนึ่งเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงต่ำกว่าหรือเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร จะทำการดึงน้ำหมักออกมา 40% แล้วทำการเติมไวน์ข้าวไร้ที่ปรับ TC เท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร เข้าไป 40% ของน้ำหมัก (Krusong et al., 2007, 2010; Krusong and Vichitraka, 2011)

3.6 การเปรียบเทียบการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพ การสร้างสารระเหย และสมบัติ Over-oxidation ของเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* ที่ผ่านการคัดเลือกและเชื้อแบคทีเรียอะซิติก *Acetobacter aceti* ภายใต้กระบวนการหมักแบบ High initial acetic acid concentration (HAA.)

สภาพการผลิตกรดอะซิติกที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบของเชื้อ *Paenibacillus* และ *A. aceti* แสดงอยู่ในหัวข้อ 3.1 โดยทำการศึกษาในถังหมัก internal Venturi injector (iVi) bioreactor (Krusong et al., 2015) ต้นแบบขนาด 100 ลิตร มีการหมุนวนน้ำหมักด้วย centrifugal pump (Grundfos Ltd., Bangkok, Thailand) และให้อากาศเข้าไปในถังหมักผ่านทาง injector nozzle (Mazzei Injector Com., LLC, Bakersfield, CA, USA) ที่ 7.25-14.5 psi

ปกติการเริ่มต้นการผลิตกรดอะซิติกประกอบด้วย 2 ช่วง – ช่วงเริ่มต้น (start up phase) และช่วงดำเนินการผลิต (Operational phase) ในช่วงเริ่มต้นเป็นช่วงที่หัวเชื้อทำการปรับสภาพให้เข้ากับน้ำหมักภายหลังจากการถ่ายเชื้อปริมาตรน้ำหมักที่ใช้เท่ากับ 25 ลิตรและใช้อากาศที่ความดัน 7.25 psi (Krusong et al., 2015) ช่วงเริ่มต้นนี้จะสิ้นสุดเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ (หรือ เอทานอล) ในน้ำหมักเหลือเท่ากับหรือต่ำกว่า 5 กรัมต่อลิตร (Fregapane et al., 2001; de Ory et al., 2004) สำหรับช่วงดำเนินการผลิตจะเริ่มขึ้นทันทีเมื่อเติมน้ำหมักใหม่ (ที่ปรับส่วนผสมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร และเติมสารอาหาร complex medium) ให้มีปริมาตร 75 ลิตร และใช้ความดันอากาศที่ 14.5 psi (Krusong et al., 2015) การผลิตในแต่ละรอบในช่วงดำเนินการผลิตจะเสร็จสมบูรณ์เมื่อเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ (หรือ เอทานอล) ในน้ำหมักเหลือเท่ากับหรือต่ำกว่า 5 กรัมต่อลิตร

ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติก (acetification performance) ของเชื้อ *Paenibacillus* ที่คัดแยกได้และ *A. aceti* ในทั้งช่วงเริ่มต้นและช่วงดำเนินการผลิต ขณะเดียวกันติดตามการเกิดปฏิกิริยา Over-oxidation ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์หลังจากที่ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักเหลือเท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร โดยอาศัยการ

ยัดช่วงระยะเวลาการหมักภายใต้สภาพที่มีการให้อากาศคงเดิม ทำการติดตามการลดลงของกรดอะซิติกซึ่งจะบอกว่าเชื้อใดมีสมบัติในการเกิด Over-oxidation

สำหรับการหาสารระเหย (volatile components) ในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักจากเชื้อ *Paenibacillus* และ *A. aceti* นั้นอาศัยการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วย Gas chromatography–mass spectrometry ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3.7 การผลิตกรดอะซิติกชีวภาพด้วยระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องด้วยเชื้อ *Paenibacillus*

ทำการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติกด้วยเชื้อ *Paenibacillus* จำนวน 9 รอบ (ไม่รวมช่วงเริ่มต้น) ในสภาพกระบวนการหมักแบบ High initial acetic acid concentration (HAA; ปรับให้มีความเข้มข้นโดยรวม (total concentration; TC) เท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร ดังมีรายละเอียดที่กล่าวถึงแล้วในข้อ 3.1) ในถังหมัก iVi ต้นแบบขนาด 100 ลิตร (ดังมีรายละเอียดที่กล่าวถึงแล้วในข้อ 3.6) ทำการติดตาม (1) อัตราการสร้างกรดอะซิติก (acetification rate; ETA; คำนวณจากความต่างระหว่างกรดอะซิติกเมื่อสิ้นสุดและเมื่อเริ่มต้นการหมัก) ของแต่ละรอบของการผลิต (2) Biotransformation yield (เปอร์เซ็นต์ของแอลกอฮอล์หรือเอทานอลที่เปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก) (Fregapane et al. 2001; de Ory et al., 2004; Krusong et al., 2015) และ (3) cell biomass ในลักษณะของค่า cell dried weight (CDW)

3.8 วิธีวิเคราะห์ Analytical methods

ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องวัดแอลกอฮอล์ Ebulliometer และค่าความเป็นกรด (acidity) ด้วยวิธีการไตเตรชันด้วย IN NaOH

Cell biomass ในลักษณะของ cell dry weight (CDW) อาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (GENESYS 10VIS) ทั้งนี้ตัวอย่างน้ำหมักจะต้องทำการเจือจางให้ค่า OD_{660นาโนเมตร} อยู่ระหว่าง 0.3-0.8 และแปลงเป็นค่า CDW ด้วย Linear correlation standard curve ของเชื้อ *Paenibacillus* โดย 1 DO_{660นาโนเมตร} เทียบเคียงได้กับค่า 0.3 กรัมต่อลิตร (Krusong and Tantratian, 2014).

การวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารระเหย (volatile components) ที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์จากการหมักจากเชื้อ *Paenibacillus* และ *A. aceti* ถูกแยกออกด้วย solid phase micro-extraction (SPME) (ดัดแปลงจาก Vas and Vékey, 2004) และวัดด้วย GC-MS สำหรับขั้นตอนอย่างพอสังเขปมีรายละเอียดดังนี้ นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์มา 5 มล. ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 25 มล. (เหลือปริมาตรเหนือตัวอย่าง 20 มล.) จากนั้นเติม NaCl (ในรูปของแข็ง) 3 กรัม และปิดปากขวดแก้วด้วย septum cap (Stableflex PDMS/DVB for SPME fiber size 60 μm; Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) หลังจากสกัดเป็นเวลา 60 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารระเหยด้วย GC-MS โดยฉีดตัวอย่างและรักษาไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปรับให้อุณหภูมิสูงขึ้นในอัตรา 5

องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส และรักษาให้คงที่เป็นเวลา 5 นาที สำหรับการหา mass spectrometry (MS) ใช้ electron ionization mode ที่ ion source temperature เท่ากับ 230 องศาเซลเซียส ช่วง scan mass เท่ากับ 35-300 amu และ MS transfer line ที่ 240 องศาเซลเซียส โดยใช้ solvent delay time ที่ 0 นาที ทั้งนี้การจำแนกส่วนประกอบของสารระเหยขึ้นกับ retention times และ mass spectra fragmentation patterns สำหรับผลการเปรียบเทียบเชิงคุณภาพ (qualitative comparison) โดยใช้ Wiley, 275.L data library สำหรับระบบ GC-MS

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทั้งหมดทำ 3 ซ้ำ และรายงานเป็นค่าเฉลี่ยกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

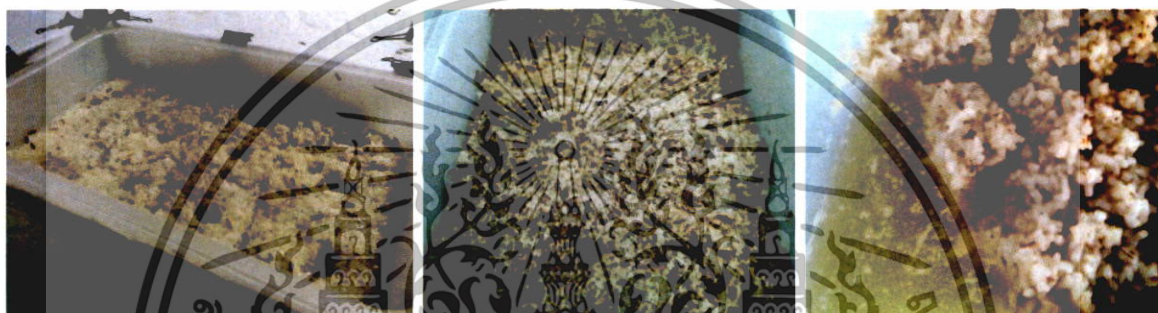


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรีย Spore former-acid producing bacteria จากวัตถุดิบข้าวที่ผ่านย่อย

ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรด (Spore former-acid producing bacteria) ได้เลือกใช้ตัวอย่างข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเชือราดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ลักษณะตัวอย่างข้าวที่ผ่านการย่อยเพื่อใช้ในการแยกแบคทีเรียที่ปนเปื้อน

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่าง เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนและมีแนวโน้มในการสร้างกรด ได้ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรดที่ปนเปื้อนจากข้าวที่ผ่านขั้นตอนการย่อยให้เป็นน้ำตาล

ตัวอย่าง	จำนวนเชื้อแบคทีเรียสร้างกรด	จำนวนเชื้อที่สร้างสปอร์และสร้างกรด	รหัสเชื้อที่สร้างสปอร์และสร้างกรด
1	2	2	P1,P2
2	NF	NF	-
3	NF	NF	-
4	NF	NF	-
5	1	-	-
6	1	1	P3
7	2	1	P4
8	NF	NF	-

NF = Not found

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

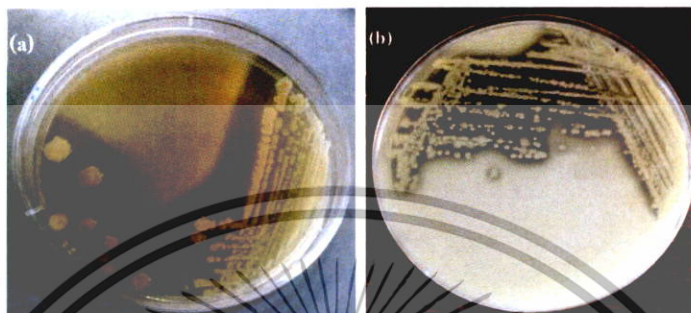
ตัวอย่าง	จำนวนเชื้อแบคทีเรียสร้างกรด	จำนวนเชื้อที่สร้างสปอร์และสร้างกรด	รหัสเชื้อที่สร้างสปอร์และสร้างกรด
9	NF	NF	-
10	NF	NF	-
11	NF	NF	-
12	3	3	P5,P6,P7
13	2	1	P8
14	1	1	P9
15	NF	NF	-
16	NF	NF	-
17	1	-	-
18	1	1	P10
19	NF	NF	-
20	NF	NF	-
21	1	1	P11
22	1	-	-
23	NF	NF	-
24	NF	NF	-
25	2	1	P12
26	NF	NF	-
27	NF	NF	-
28	NF	NF	-
29	NF	NF	-
30	3	3	15

NF = Not found

จากผลที่พบจากตารางที่ 4.1 ระบุได้ว่า แบคทีเรียที่สร้างกรดพบใน 13 ตัวอย่าง (คิดเป็น 43.3% ของตัวอย่างทั้งหมด) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่สร้างกรดที่ตรวจพบมีเพียง 15 เชื้อเท่านั้นที่มีรูปร่างเป็นสปอร์ โดยกำหนดให้รหัส P1-P15 ซึ่งใช้ในการศึกษาต่อไป สำหรับภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และกรดที่คัดเลือกได้โดยเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Paenibacillus*-basal medium ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งสังเกตได้ว่าแบคทีเรียที่สร้างกรดจะสามารถทำให้เกิดบริเวณใส (Clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ทั้งนี้ในภาพที่ 4.2 (a) สามารถสังเกตเห็นว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

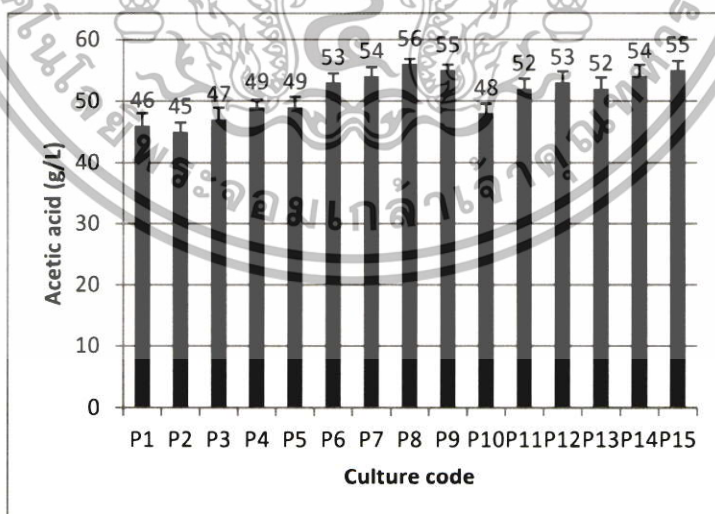
มีแบคทีเรียที่สร้างกรดที่มีโคโลนี 2 ลักษณะ คือ โคโลนีกลม เยิ้ม ขนาดเล็ก (ด้านขวาของภาพ) และโคโลนีใหญ่ ผิวขอบหยักและเยิ้ม (ด้านซ้ายของภาพ) ในขณะที่ภาพที่ 4.2 (b) เป็นตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ที่เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรดได้ซึ่งเป็นเป้าหมายของการศึกษา



ภาพที่ 4.2 ลักษณะของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร *Paenibacillus*-basal medium ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต :
 (a) โคโลนีสองลักษณะที่สามารถกรดได้; (b) โคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรด

4.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดอะซิติกได้ในสภาพกรดอะซิติกสูง

ผลของการหมักเพื่อผลิตของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จำนวน 15 เชื้อ (รหัส P1-P15) เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 30 วัน ในสภาพความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration; TC) เท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสภาพการหมักน้ำส้มสายชูในกระบวนการ High initial acetic acid concentration หรือที่เรียกว่า “HAA process” (Krusong et al., 2015) ซึ่งพบว่า เชื้อรหัส P8 ให้ปริมาณกรดสูงสุดดังแสดงในภาพที่ 4.3

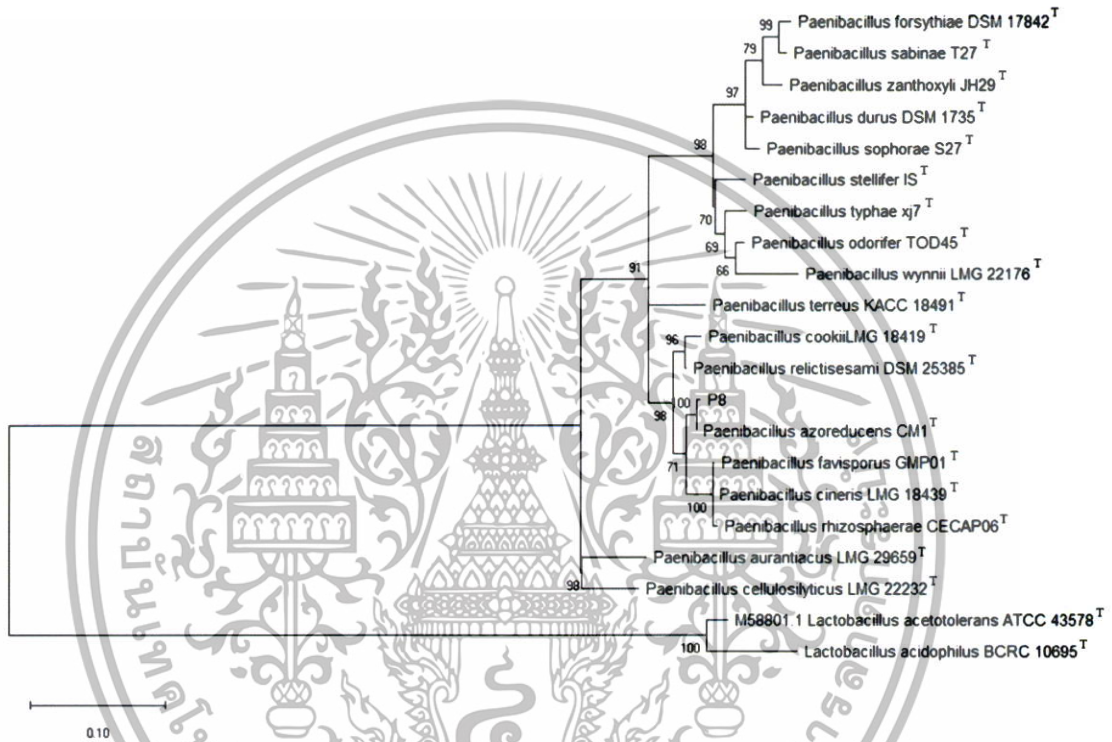


ภาพที่ 4.3 ปริมาณกรดที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 15 เชื้อ รหัส P1-P15 ในการหมักเพื่อผลิตกรดในสภาพ High initial acetic acid concentration ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 16S sequencing และ phylogenetic analysis ของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรดที่สามารถผลิตกรดอะซิติกสูงสุด

จากผลที่ได้จึงเลือกเชื้อรหัส P8 ใช้ในการศึกษาถัดไปพร้อมวิเคราะห์สายพันธุ์ด้วย 16S DNA sequencing ซึ่งผลของการวิเคราะห์ระบุว่าเป็นเชื้อที่คัดเลือกได้เป็นสายพันธุ์ *Paenibacillus azoreducens* ดังแสดงในภาพที่ 4.4

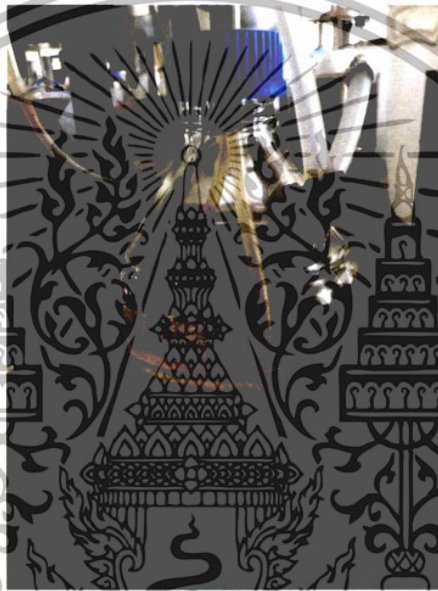


ภาพที่ 4.4 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส P8 ที่สามารถผลิตกรดได้สูงสุด

ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียรหัส P8 อาศัยการตรวจหา 16S rRNA gene sequence (1515 bp) จากผลที่แสดงในภาพที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่ามีกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีวิวัฒนาการมาจากฐานเดียวกันจำนวน 3 กลุ่ม ทั้งนี้ผลของ 16S rRNA sequence ของเชื้อแบคทีเรียรหัส P8 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงถึง 99.85% ของเชื้อ *Paenibacillus azoreducens* CM1^T ในขณะที่ค่า distant index ของทั้งเชื้อแบคทีเรียรหัส P8 และ *P. azoreducens* CM1^T เท่ากับ 0.145% ซึ่งหมายถึง sequence similarity เท่ากับ 99.85% นั่นเอง นอกจากนี้แล้วจากการคำนวณของ average distant ของเชื้อทั้ง 21 สายพันธุ์สามารถสันนิษฐานได้ว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส P8 เป็นสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อแบคทีเรีย *P. azoreducens*

4.4 การปรับสภาพเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus azoreducens* ในสภาพที่มีกรดอะซิติกเริ่มต้นสูง

โดยธรรมชาติของการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพให้มีปริมาณกรดอะซิติกสูงนั้น จำเป็นต้องทำให้หัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดอะซิติกสามารถปรับสภาพให้เข้ากับสภาพที่มีความเข้มข้นกรดอะซิติกสูงได้ซึ่งในการศึกษานี้กำหนดไว้ที่ความเข้มข้นโดยรวมเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเริ่มต้นตั้งแต่การปรับสภาพหัวเชื้อที่คัดเลือกได้ *P. azoreducens* ให้เข้ากับไวน์ข้าวไร้ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ทั้งนี้ปริมาณกรดที่เชื้อสามารถสร้างขึ้นจำนวน 3 รอบ (30 วันต่อรอบการปรับ) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 55 ± 3 กรัมต่อลิตร



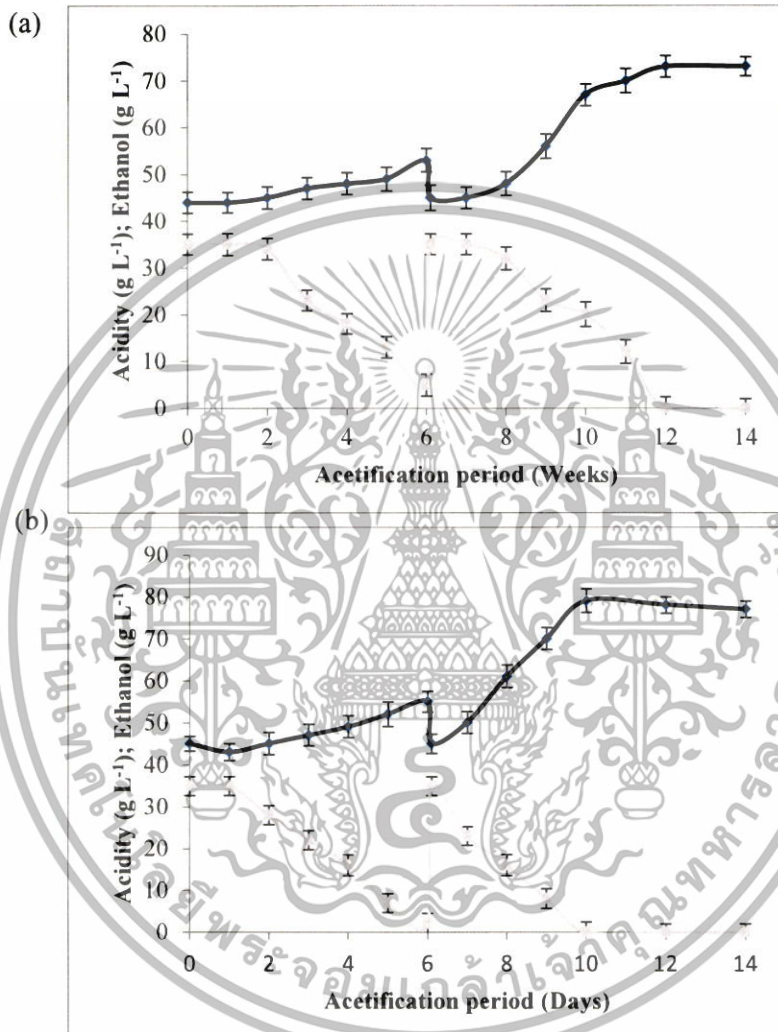
ภาพที่ 4.5 ลักษณะการปรับเชื้อ *Paenibacillus azoreducens* ภายใต้สภาพ High initial acetic acid concentration ที่ความเข้มข้นโดยรวมเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง

4.5 การเปรียบเทียบการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพ การสร้างสารระเหย และสมบัติ Over-oxidation ของเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* ที่ผ่านการคัดเลือกและเชื้อแบคทีเรียอะซิติก *Acetobacter aceti* ภายใต้กระบวนการหมักแบบ High initial acetic acid concentration (HAA)

การเปรียบเทียบการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพ

ตามปกติภายหลังจากที่มีการถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในน้ำหมักแบคทีเรียมีความจำเป็นต้องปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ แต่ความสามารถในการปรับตัวขึ้นกับลักษณะของสายพันธุ์ของแบคทีเรานั้น (Gullo et al., 2014) สำหรับเชื้อที่คัดแยกออกมา *P. azoreducens* ใช้เวลา 6 สัปดาห์ในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพการผลิตกรดอะซิติกด้วย

กระบวนการ high initial acetic acid (HAA) ซึ่งเป็นสภาพการหมักที่รุนแรงสำหรับแบคทีเรียส่วนใหญ่ (ภาพที่ 4.6a) ในทางตรงกันข้ามเชื้อแบคทีเรียอะซิติก *A. aceti* ใช้เวลาเพียง 6 วัน (ภาพที่ 4.6).



ภาพที่ 4.6 การผลิตกรดอะซิติกด้วยกระบวนการ high initial acetic acid concentration ด้วยเชื้อแบคทีเรีย: (a)

Paenibacillus azoreducens; (b) *Acetobacter aceti*

หมายเหตุ : ความเข้มข้นของกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์เท่ากับ 45 และ 35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

สัญลักษณ์: ◆ , acidity; ■ , ethanol

ค่าที่แสดงเป็นผลของการวิเคราะห์ทั้งหมดทำ 3 ซ้ำ และรายงานเป็นค่าเฉลี่ยกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับช่วงดำเนินการผลิตนั้นเชื้อ *P. azoreducens* ต้องการเวลาถึง 6 สัปดาห์ ในขณะที่เชื้อ *A. aceti* ต้องการเวลาเพียง 4 วัน อย่างไรก็ตามผลของปริมาณกรดที่เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ผลิตใกล้เคียงกัน คือ 73 กรัมต่อลิตร ที่ผลิตโดยเชื้อ *P. azoreducens* และ 79 กรัมต่อลิตร จากเชื้อ *A. aceti*

สมบัติ Over-oxidation

ในกรณีของการทดสอบปฏิกิริยา **Over-oxidation** โดยอาศัยการติดตามการเปลี่ยนแปลงของกรด หลังจากจากการหมักเสร็จสมบูรณ์ (มีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร) โดยพบว่าปริมาณกรดของเชื้อ *P. azoreducens* ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (73 กรัมต่อลิตร; ภาพที่ 4.6a) หลังจากการหมักสัปดาห์ที่ 12-14 weeks แต่เกิดการลดลงของกรด (จาก 79 กรัมต่อลิตร เป็น 77 กรัมต่อลิตร) ของเชื้อ *A. aceti* หลังจากการหมักในวันที่ 10-14

การสร้างสารระเหย

นอกจากกรดอะซิติกที่ถูกสร้างขึ้นทั้งโดยเชื้อ *P. azoreducens* และ *A. aceti* ยังมีสารระเหย (volatile components) อีกซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS จากผลการศึกษาที่แสดงในตารางที่ 2 และตารางที่ 3 พบว่า ในระหว่างสารระเหย 40 และ 37 ชนิดที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *P. azoreducens* และ *A. aceti* ตามลำดับ มีจำนวน 20 ชนิด ที่พบในผลิตภัณฑ์จากทั้งสองสายพันธุ์ และในกลุ่มดังกล่าวมีเพียงสารระเหย 8 ชนิด ที่เป็นสารประกอบหลัก (main components) ซึ่งประกอบด้วย (1) ethyl acetate; (2) methane, oxybis-; (3) isoamylalcohol; (4) 2-butanone, 3-hydroxy-; (5) acetic acid; (6) benzaldehyde; (7) propanoic acid, 2-methyl-; และ (8) pentanoic acid นอกจากนี้แล้วผลวิเคราะห์จาก GC-MS สามารถยืนยันได้ว่ากรดอะซิติกสามารถตรวจพบเป็นสารประกอบหลักในผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยเชื้อ *P. azoreducens* ซึ่งแสดงว่าเชื้อ *P. azoreducens* สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 สารระเหย (volatile components) ของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อ *Paenibacillus azoreducens* เมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS

Component RT	Compound Name	CAS#	Formula*	Component Area	Match Factor	% of Total
3.4066	Acetaldehyde*	75-07-0	C_2H_4O	4828477.5	91.3	0.03
5.0955	Ethyl Acetate*	141-78-6	$C_4H_8O_2$	2353245444	94.6	15.69
5.8865	Methane, oxybis-*	115-10-6	C_2H_6O	1446391003	94.6	9.64
7.5917	Acetic acid, 2-methylpropyl ester*	110-19-0	$C_6H_{12}O_2$	139127423.7	89.3	0.93
8.1925	Butanoic acid, ethyl ester	105-54-4	$C_6H_{12}O_2$	94570465.9	93.8	0.63
9.0075	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	108-64-5	$C_7H_{14}O_2$	24353399.3	81.2	0.16
9.1197	Disulfide, dimethyl*	624-92-0	$C_2H_6S_2$	3128137.3	68.7	0.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.6436	<i>Isobutylalcohol*</i>	78-83-1	$C_4H_{10}O$	2559288.9	82.6	0.02
10.7144	<i>1-Butanol, 3-methyl-, acetate*</i>	123-92-2	$C_7H_{14}O_2$	34999276.3	93.8	0.23
11.5766	1,3-Dioxolane, 4,5-dimethyl-2-pentadecyl-	56599-61-2	$C_{20}H_{40}O_2$	793322.3	68.3	0.01
11.9103	Oxazole, 4,5-dimethyl-	20662-83-3	C_5H_7NO	20468078.4	84.2	0.14
13.3035	<i>Isoamylalcohol*</i>	137-32-6	$C_5H_{12}O$	185441662.4	95.6	1.24
15.1769	Pyrazine, methyl-	109-08-0	$C_5H_6N_2$	48512571.6	92.4	0.32
15.5356	<i>2-Butanone, 3-hydroxy-*</i>	513-86-0	$C_4H_8O_2$	168997872.5	93.6	1.13
17.04	<i>Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester*</i>	97-64-3	$C_7H_{10}O_3$	33654169.2	78.5	0.22
18.0772	<i>3-(Acetyloxy)-2-butanone*</i>	4906-24-5	$C_6H_{10}O_3$	20934458.3	90.4	0.14
18.3692	<i>Acetic acid*</i>	64-19-7	$C_2H_4O_2$	5789197422	94.8	7.21
19.8976	2-furan-carboxaldehyde	98-01-1	$C_5H_4O_2$	670371399.3	91.9	4.47
21.2164	<i>Benzaldehyde*</i>	100-52-7	C_7H_6O	540672023.9	96.8	3.6
21.7543	<i>2-Butanone, 4-(acetyloxy)-*</i>	10150-87-5	$C_6H_{10}O_4$	25995012.6	73.6	0.17
21.8405	<i>Propanoic acid, 2-methyl-*</i>	79-31-2	$C_4H_8O_2$	301178116.4	90.5	2.01
22.9552	<i>Butanoic acid*</i>	107-92-6	$C_4H_8O_2$	67991028.8	93.4	0.45
23.6423	<i>Pentanoic acid*</i>	109-52-4	$C_5H_{10}O_2$	752384100.6	92	5.02
25.1307	<i>Naphthalene*</i>	91-20-3	$C_{10}H_8$	3087984.8	92.8	0.02
25.3551	(S)-(+)-Isoleucinol	24629-25-2	$C_6H_{15}NO$	16888981.6	73	0.11
25.6463	Acetic acid, phenyl-, ethyl ester	101-97-3	$C_{10}H_{12}O_2$	23761288.8	92.8	0.16
25.8559	Acetophenone, 2,4,5-triethyl-	2715-54-0	$C_{14}H_{20}O$	2027351.4	83.2	0.01
26.1146	<i>Acetic acid, 2-phenylethyl ester*</i>	103-45-7	$C_{10}H_{12}O_2$	61756862.5	97.1	0.41
26.3835	<i>Hexanoic acid*</i>	142-62-1	$C_6H_{12}O_2$	79128285.9	94.6	0.53
26.7035	3-Buten-2-one, 3-methyl-4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-	127-51-5	$C_{14}H_{22}O$	1576299.6	83.4	0.01
27.0345	Adipic acid, 2,4-dimethylpent-3-yl isobutyl ester	2000532-52-8	$C_{17}H_{32}O_4$	3406092.8	68	0.02
27.436	<i>Benzeneethanol*</i>	60-12-8	$C_8H_{10}O$	348606610.5	97.3	2.32
28.6518	Phenol	108-95-2	C_6H_6O	1694766.4	76	0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28.7834	Pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4-di-t-butylphenyl esters	166273-38-7	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	892790.9	67	0.01
29.2712	Octanoic acid	124-07-2	C ₈ H ₁₆ O ₂	39195729.5	93.5	0.26
29.4892	Caryophyllenyl alcohol	913176-41-7	C ₁₅ H ₂₆ O	2530766.1	64	0.02
31.8485	Decanoic acid	334-48-5	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1056726.4	72.3	0.01
32.2686	5,6,7,8-Tetrahydro-8,8-dimethyl-2-indolizinecarboxylic acid methyl ester	2000224-92-1	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	1650383131	82.1	11
33.8314	Benzoic acid	65-85-0	C ₇ H ₆ O ₂	7451135.9	71.1	0.05
36.1808	3-amino-4,5,6-trimethyl-thieno[2,3-B]pyridine-2-carboxylic acid tert-butylamide	2000501-84-7	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ OS	16468136.4	60.6	0.11

* ชื่อสารประกอบและสูตรซึ่งพิมพ์เป็นอักษรตัวอน หมายถึง สารประกอบที่ตรวจพบใน GC-MS chromatogram ของทั้งเชื้อ *P. azoreducens* และ *A. aceti*

ตารางที่ 4.3 สารระเหย (volatile components) ของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อ *Acetobacter aceti* เมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS.

Component RT	Compound Name	CAS#	Formula*	Component Area	Match Factor	% of Total
3.4061	Acetaldehyde*	75-07-0	C ₂ H ₄ O	6999246.9	83.4	0.06
5.0465	Ethyl Acetate*	141-78-6	C ₄ H ₈ O ₂	1308584233	94.6	10.91
5.8372	Methane, oxybis-*	115-10-6	C ₂ H ₆ O	347279202.7	89.8	2.89
6.803	2,3-Butanedione	431-03-8	C ₄ H ₆ O ₂	271480011.7	92.5	2.26
7.5834	Isobutyl acetate	110-19-0	C ₆ H ₁₂ O ₂	122616008.8	93.5	1.02
9.1324	Disulfide, dimethyl*	624-92-0	C ₂ H ₆ S ₂	11247301.7	64.3	0.09
9.6442	Isobutylalcohol*	78-83-1	C ₄ H ₁₀ O	8118441.1	91.6	0.07
10.5573	3-methylbutyl 2-oxopropanoate	7779-72-8	C ₈ H ₁₄ O ₃	25893946.9	92.2	0.22
10.8224	1-Butanol, 3-methyl-, acetate*	123-92-2	C ₇ H ₁₄ O ₂	98998845.5	96.5	0.83
13.4474	Isoamylalcohol*	123-51-3	C ₅ H ₁₂ O	348946523.7	95.5	2.91
14.2065	Acetic acid, anhydride	108-24-7	C ₄ H ₆ O ₃	10738673.1	83.5	0.09
15.6043	2-Butanone, 3-hydroxy-*	513-86-0	C ₄ H ₈ O ₂	286712291	93.1	2.39
17.0678	Propanoic acid, 2-hydroxy-,	97-64-3	C ₃ H ₁₀ O ₃	82300126.9	96.9	0.69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	<i>ethyl ester*</i>					
17.5423	1,3-Dioxan-5-ol, 4,4,5-trimethyl-	54063-14-8	C ₇ H ₁₄ O ₃	4713875.2	62.9	0.04
18.0929	3-(Acetyloxy)-2-butanone*	4906-24-5	C ₆ H ₁₀ O ₃	13094275.1	91.9	0.11
18.2338	Acetic acid*	64-19-7	C ₂ H ₄ O ₂	7142863733	95.1	7.89
21.2608	Benzaldehyde*	100-52-7	C ₇ H ₆ O	463180655.9	84.5	3.86
21.7532	2-Butanone, 4-(acetyloxy)-*	10150-87-5	C ₆ H ₁₀ O ₃	12569367.4	71.7	0.49
21.8385	Propanoic acid, 2-methyl-*	79-31-2	C ₄ H ₈ O ₂	253806031.2	91.8	2.12
22.1427	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	620-02-0	C ₆ H ₆ O ₂	55092770.7	91.7	0.46
22.3792	1-cyclopentene-3,4-dione	2000008-43-4	C ₅ H ₄ O ₂	35233139.8	83.7	0.29
22.9643	Butanoic acid*	107-92-6	C ₄ H ₈ O ₂	25357116.2	88.6	0.21
23.235	2(3H)-Furanone, dihydro-	96-48-0	C ₄ H ₆ O ₂	7850092.2	62.3	0.07
23.4808	Benzeneacetaldehyde	122-78-1	C ₈ H ₈ O	8709543.5	85.4	0.07
23.6736	Pentanoic acid*	109-52-4	C ₅ H ₁₀ O ₂	216205300.7	89.9	1.8
24.2235	L-α-Terpineol	10482-56-1	C ₁₀ H ₁₈ O	3331502.1	69.9	0.03
24.4952	1-Propanol, 3-(methylthio)-	505-10-2	C ₃ H ₁₀ OS	8659909.4	81.1	0.07
24.7854	Acetic acid, phenylmethyl ester	140-11-4	C ₉ H ₁₀ O ₂	3705089	71.1	0.03
25.1377	Naphthalene*	91-20-3	C ₁₀ H ₈	8544835.9	94.8	0.07
25.3566	2-Butenoic acid	3724-65-0	C ₄ H ₆ O ₂	5065418.9	74.4	0.04
26.1187	Acetic acid, 2-phenylethyl ester*	103-45-7	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	98203150.3	98.3	0.82
26.3913	Hexanoic acid*	142-62-1	C ₆ H ₁₂ O ₂	9829193	90.9	0.08
26.9161	Benzyl alcohol	100-51-6	C ₇ H ₈ O	7094432.2	94.3	0.06
27.44	Benzeneethanol*	60-12-8	C ₈ H ₁₀ O	632879130.3	97.7	5.27
30.6742	4,4-Dimethyl-3-(3-methylbut-2-enylidene)octane-2,7-dione	98419-10-4	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	1016732.5	65.5	0.01
33.8524	.beta.-1,5-O-Dibenzoyl-ribofuranose	2000696-25-7	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	3794906.6	67.1	0.03
34.651	5-Hydroxymethylfurfural	67-47-0	C ₆ H ₆ O ₃	1561246.1	67.5	0.01

* ชื่อสารประกอบและสูตรซึ่งพิมพ์เป็นอักษรตัวเอน หมายถึง สารประกอบที่ตรวจพบใน GC-MS chromatogram ของทั้งเชื้อ *P. azoreducens* และ *A. aceti*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การผลิตกรดอะซิติกชีวภาพด้วยระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องด้วยเชื้อ *Paenibacillus azoreducens*

จากการศึกษาของ Ndoye et al. (2007) และ Krusong et al. (2015) รายงานว่า การผลิตกรดอะซิติกจะเสร็จสมบูรณ์เมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหลืออยู่ในน้ำหมักเท่ากับหรือต่ำกว่า 5 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการผลิตกรดอะซิติกด้วยระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องจึงเริ่มต้นเมื่อมีการดึงเอาน้ำหมัก (ในที่นี้ คือ ผลิตภัณฑ์) ออกจากถังหมักเป็นปริมาตร 40% ของปริมาตรน้ำหมักที่ใช้ในการหมัก (80 ลิตร ในถังหมัก iVi ขนาด 100 ลิตร) จากนั้นจึงเติมน้ำหมัก (ที่ปรับสภาพความเข้มข้นทั้งหมด 80 กรัมต่อลิตร และสารอาหาร complex medium) ปริมาตร 40% ของปริมาตรน้ำหมัก การหมักในรอบถัดไปจึงเริ่มต้นขึ้น สำหรับผลการหมักจำนวน 9 รอบ แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการผลิตกรดอะซิติกด้วยระบบกึ่งต่อเนื่องภายใต้กระบวนการ high initial acetic acid concentration (HAA) จากเชื้อ *Paenibacillus azoreducens* ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส (ความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร)

Experiment Time (Week)	Total acidity*		Acid produced* (g L ⁻¹)	ETA (g L ⁻¹ W ⁻¹)	Ethanol*		Ethanol oxidized* (g L ⁻¹)	Bio-transformation Yield (%)	CDW (g L ⁻¹)	
	Initial (g L ⁻¹)	Final (g L ⁻¹)			Initial (g L ⁻¹)	Final (g L ⁻¹)				
Start up	6	44±0.2	53±0.1	9±0.1	1.5	35±0.1	4.9±0.1	30.1±0.1	29.9	0.026
Cycle 1	6	45±0.3	73±0.3	28±0.3	4.7	35±0.3	3±0.2	32±0.2	87.5	0.029
Cycle 2	5	45±0.2	75±0.2	30±0.2	6	35±0.4	1±0.1	34±0.2	88.2	0.043
Cycle 3	5	45±0.3	78±0.2	33±0.2	6.6	35±0.1	1±0.1	34±0.1	97.1	0.045
Cycle 4	5	45±0.2	76±0.3	31±0.2	6.2	35±0.3	2±0.3	33±0.3	93.9	0.04
Cycle 5	5	45±0.5	78±0.4	33±0.4	6.6	35±0.3	1±0.2	34±0.2	97.1	0.048
Cycle 6	6	45±0.2	69±0.5	24±0.3	4	35±0.1	3±0.1	32±0.1	75	0.027
Cycle 7	6	45±0.4	70±0.2	25±0.3	4.2	35±0.1	3±0.1	32±0.1	78.1	0.031
Cycle 8	5	45±0.5	79±0.2	34±0.3	6.8	35±0.3	0	35±0.3	97.1	0.042
Cycle 9	5	45±0.3	78±0.5	33±0.4	6.6	35±0.2	1±0.1	34±0.1	97.1	0.048
Average**					5.7				90.1	

* ค่าที่แสดงเป็นผลของการวิเคราะห์ทั้งหมดทำ 3 ซ้ำ และรายงานเป็นค่าเฉลี่ยกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

** ค่าเฉลี่ย ETA และ biotransformation yield คำนวณจากทั้ง 9 รอบของการผลิต โดยไม่รวมช่วงเริ่มต้น (start-up phase)

คำย่อ : ETA, acetification rate และ CMC, cell dry weight.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่เรีย Spore former-acid producing bacteria จากวัตถุดิบข้าวที่ผ่านย่อย

จากการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกภายใต้สภาพ high initial acetic acid concentration พบเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรดได้ 15 ไอโซเลทซึ่งมีรหัส P1-P15

5.1.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดอะซิติกได้ในสภาพกรดอะซิติกสูง

จากรายงานของ Krusong and Tantratian (2014) และ Krusong et al. (2014) ระบุว่าการใช้กรดอะซิติก 45 กรัมต่อลิตรปรับน้ำหมักก่อนถ่ายหัวเชื้อสำหรับการผลิตกรดอะซิติกตามกระบวนการผลิตแบบ high initial acetic acid concentration หรือ “HAA” วัตถุประสงค์เพื่อใช้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของกรดอะซิติกต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทำให้กระบวนการผลิตแบบ HAA นี้ใช้ต้นทุนในการเตรียมน้ำหมักที่ต่ำลงเนื่องจากไม่ต้องใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อในน้ำหมัก อย่างไรก็ตามแบคทีเรียอะซิติกบางสายพันธุ์โดยเฉพาะ *Acetobacter* spp. ซึ่งใช้ในการผลิตกรดอะซิติกในระดับอุตสาหกรรมสามารถพัฒนาความสามารถในการต้านทานต่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่สูงได้เมื่อปรับตัวเข้ากับสภาพการหมักในระดับอุตสาหกรรมอย่างเพียงพอ (Azuma et al., 2009; Gullo et al., 2016).

นอกจากนี้ยังมีรายงานจากการศึกษาต่างๆระบุว่ากรดอะซิติกที่ความเข้มข้นสูงกว่า 20 กรัมต่อลิตรมีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย ขณะที่ความเข้มข้นที่สูงกว่า 40 กรัมต่อลิตรจะส่งผลทำให้การเจริญช้าลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ 60 กรัมต่อลิตร จะส่งผลยับยั้งอย่างสูง (70%) (Soo Park et al., 1989; Lasko et al., 2001; de Ory et al., 2002) อนึ่งรายงานของ Torija et al. (2010) ระบุว่าความสามารถในการต้านทานความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่สูงมีผลสำคัญต่อกิจกรรม ethanol oxidation จากที่กล่าวมาเป็นเหตุผลของการศึกษานี้ที่มุ่งเน้นในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรดซึ่งมีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่สูงได้เพื่อใช้ในการผลิตกรดอะซิติกผ่านทางกระบวนการผลิต HAA ทั้งนี้จากการศึกษา พบว่า เชื้อรหัส P8 เป็นไอโซเลทที่สามารถผลิตกรดอะซิติกได้

5.1.3 16S sequencing และ phylogenetic analysis ของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรดที่สามารถผลิตกรดอะซิติกสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์และสร้างกรดหัต P8 ได้นำไปจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัย nucleotide sequence และผลที่ได้รับยืนยันว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Paenibacillus azoreducens* ที่มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 99.855%

5.1.4 การปรับสภาพเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus azoreducens* ในสภาพที่มีกรดอะซิติกเริ่มต้นสูง

เชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus azoreducens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรดสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพการหมักที่มีกรดอะซิติกสูงได้ เนื่องจากสามารถผลิตกรดได้ในสภาพกระบวนการผลิต high initial acetic acid concentration

5.1.5 การเปรียบเทียบการผลิตกรดอะซิติกชีวภาพ การสร้างสารระเหย และสมบัติ Over-oxidation ของเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* ที่ผ่านการคัดเลือกและเชื้อแบคทีเรียอะซิติก *Acetobacter aceti* ภายใต้กระบวนการหมักแบบ High initial acetic acid concentration (HAA)

การค้นหากิจกรรมการสร้างกรดอะซิติกของไอโซเลท *P. azoreducens* ในการหมักในสภาพ HAA พบว่า acetification profile ทั้งช่วงเริ่มต้น (start-up phase) และช่วงดำเนินการผลิต (operational phase) มีลักษณะคล้ายคลึงกับของ *A. aceti* อย่างไรก็ตามเชื้อ *P. azoreducens* ใช้เวลาของทั้งสองช่วงนานกว่าเชื้อ *A. aceti* อาจเนื่องจากมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เมมเบรนทั้ง aldehyde dehydrogenase (ALDH) และ alcohol dehydrogenase (ADH) ที่ต่ำกว่าของเชื้อ เชื้อ *A. aceti* ทั้งนี้เอนไซม์ทั้งสองชนิดเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแอลกอฮอล์หรือเอทานอลให้เป็นกรดอะซิติก ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงมีเป้าหมายที่จะวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองของเชื้อ *P. azoreducens* หนึ่งผลการศึกษาที่ได้รับสนับสนุนการศึกษาของ Marwoto et al. (2004) ซึ่งรายงานว่าสายพันธุ์ของเชื้อ *Paenibacillus* spp. โดยเฉพาะ *P. polymyxa* ATCC 12321 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องเน้นว่าเชื้อ *P. azoreducens* ที่คัดเลือกได้เป็นสายพันธุ์ใหม่ (novel strain) ซึ่งสามารถผลิตกรดอะซิติกได้ในสภาพที่เครียด เช่น ในกระบวนการ HAA, อีกเป้าหมายหนึ่งของการพัฒนา คือ การปรับปรุงกิจกรรมการสร้างกรดอะซิติกในถังหมัก internal Venturi injector bioreactor ต้นแบบขนาด 100 ลิตร

ประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติก (Acetification performance) ของเชื้อ *P. azoreducens* ในการหมักที่ใช้ความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร ต้องใช้เวลา 6 สัปดาห์ ขณะที่เชื้อ *A. aceti* ใช้เพียง 6 วัน สำหรับช่วงเริ่มต้น (start-up phase) ทั้งนี้ระยะเวลาของช่วงเริ่มต้นนี้ขึ้นกับปัจจัยต่างๆประกอบด้วย ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดอะซิติกและเอทานอล กรดอะซิติก (ที่เป็นผลิตภัณฑ์) และ พฤติกรรมของเชื้อ เป็นต้น ในระหว่างช่วงเริ่มต้นนี้ จำนวนของเซลล์ของเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องผลกระทบของการเงิอง (Maestre et al., 2008) แต่ก็สามารถสังเกตได้ว่าเชื้อก็สามารถค่อยๆปรับตัวได้จึงทำให้ช่วงดำเนินการผลิตสั้นลงซึ่งพบได้ในกรณีของเชื้อ *A. aceti* แต่

ตรงกันข้ามกับกรณีของเชื้อ *P. azoreducens* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจำเป็นต้องมีการพัฒนาเกี่ยวกับการปรับตัวของเชื้อ *P. azoreducens* ในถังหมัก iVi ภายใต้สภาพการหมักในกระบวนการ HAA₁ ต่อไป

ในกรณีของสมบัติ Over-oxidation ของเชื้อ *P. azoreducens* พบว่า ไม่มีการลดลงของปริมาณกรดอะซิติกภายหลังจากดำเนินการหมักต่อไปหลังจากที่ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักเท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงว่าไม่มีการเกิด over-oxidation จากเชื้อ *P. azoreducens* จัดได้ว่าเป็นข้อดีต่อการนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรม

สำหรับกรณีของสารระเหยที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ *P. azoreducens* เปรียบเทียบกับเชื้อ *A. aceti* โดยอาศัยการตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-MS ผลที่ได้รับชัดเจนและยืนยันได้ว่าเชื้อ *P. azoreducens* สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ภายใต้สภาพการหมักด้วยกระบวนการ HAA₁ ส่วนในกรณีของสารระเหยที่เรียกว่า “Organic volatile components; OVCs” ในผลิตภัณฑ์ พบว่า นอกจากกรดอะซิติกแล้ว เชื้อ *P. azoreducens* สามารถผลิตสารระเหยอีก 19 ชนิดที่พบในผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยเชื้อ *A. aceti* และในกลุ่มสารระเหยดังกล่าวมีสารระเหย 8 ชนิด ที่จัดเป็นสารระเหยหลัก (main components) ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อรสชาติทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกันของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อ *P. azoreducens* และ *A. aceti*

5.1.6 การผลิตกรดอะซิติกชีวภาพด้วยระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องด้วยเชื้อ *Paenibacillus azoreducens*
ประสิทธิภาพของการผลิตกรดอะซิติกของเชื้อ *P. azoreducens* ในระบบกึ่งต่อเนื่องในกระบวนการหมัก HAA₁ โดยใช้ความเข้มข้นทั้งหมดในน้ำหมักเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร พบว่า ทั้งช่วงการปรับตัวในช่วงเริ่มต้นและในช่วงดำเนินการผลิตใช้ระยะเวลานาน อย่างไรก็ตามผลการศึกษาระบุได้ว่าเชื้อ *P. azoreducens* สามารถต้านทานผลกระทบเชิงลบ (toxic effects) ของกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นสูงได้และยังสามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงจากสภาพการหมักที่มีปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นเท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามอัตราการผลิตกรด (acetification rate; ETA) ยังต่ำโดยฉพาะเมื่อเปรียบเทียบกับ *A. aceti* ที่พบในรายงานต่างๆ เช่น 2.2±0.06 กรัมต่อลิตรต่อวัน สำหรับเชื้อแบคทีเรียอะซิติกจากอุตสาหกรรมที่หมักในถังหมักขนาด 100 ลิตร (Fregapane et al., 2001); 12 กรัมต่อลิตรต่อวัน ด้วยเชื้อ *A. senegalensis* sp. nov. (CWBI-B418^T) ในถังหมัก acetifier ขนาด 100 ลิตร (Ndoye et al., 2007); 5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ด้วยเชื้อ *A. pasteurianus* ในถังหมัก acetator ขนาด 150 ลิตร (Mounir et al., 2018) และ 8.14±0.09 กรัมต่อลิตรต่อวัน ในถังหมัก internal Venturi injector bioreactor ขนาด 100 ลิตร (Krusong et al., 2014).

สำหรับผลการหมักด้วยระบบกึ่งต่อเนื่องที่ใช้กระบวนการ HAA₁ ของเชื้อ *P. azoreducens* พบการอัตราการผลิตกรดอะซิติกค่อยๆเพิ่มขึ้นในระหว่างรอบของการผลิตกรดอะซิติก ทั้งนี้เนื่องจากกิจกรรมของปฏิกิริยาออกซิเดชันของเชื้อ *P. azoreducens* อย่างไรก็ตามอัตราการผลิตกรดอะซิติกลดลงในบางรอบของการผลิต (รอบที่ 6-7) ทั้งนี้เนื่องจากผลกระทบของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในน้ำหมักซึ่งพบได้เช่นเดียวกันในแบคทีเรียอะซิติก (Maestre et al., 2008) เซลล์ของเชื้อ *P. azoreducens* จะเจริญได้อย่างรวดเร็วในระหว่างช่วงดำเนินการผลิต (operational phase)

และเกิดการลดลงในบางช่วงซึ่งเรียกว่า “Oscillation phase” ซึ่งจะกระทบปริมาณของเซลล์ในน้ำหมัก เนื่องจากเซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) อนึ่งพฤติกรรมที่เกิดขึ้นนี้คล้ายกับกรณีของเชื้อ *A. aceti* (Krusong et al., 2014, 2015).

ผลของ Biotransformation yield พบว่า มีค่าอยู่ในระดับที่สูงสำหรับกระบวนการผลิต HAA ของเชื้อ *P. azoreducens* ทั้งนี้ในกรณีของแบคทีเรียอะซิติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมนิยมใช้สายพันธุ์ที่ทนแอลกอฮอล์สูง หรือเรียกว่า ethanol-tolerant strain (Yuan et al., 2013) ดังนั้นในกรณีของเชื้อ *P. azoreducens* จึงน่าจะหมายความว่า เชื้อ *P. azoreducens* อาจเป็นสายพันธุ์ที่ทนกรดอะซิติกได้สูงซึ่งมีกิจกรรมในการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกที่สูงและคล้ายกับแบคทีเรียอะซิติกสายพันธุ์ทนแอลกอฮอล์สูงที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Qi et al., 2013)

สำหรับความสัมพันธ์ของอัตราการผลิตกรดอะซิติก (ETA) และ ปริมาณเซลล์ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ cell dried weight (CDW) ในระหว่างการหมักด้วยระบบกึ่งต่อเนื่องของกระบวนการผลิต HAA, จำนวน 9 รอบ พบว่า ระหว่างรอบที่ 2 พบปริมาณ CDW สูงขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งส่งผลโดยตรงต่อค่า ETA ที่สูงซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ถึงการปรับตัวของเซลล์ของเชื้อ *P. azoreducens* ภายใต้อสภาพที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดอะซิติกที่สูง นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ที่จะทำการวิจัยต่อเนืองที่จะปรับสภาพเชื้อให้เพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตกรดอะซิติกในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกเริ่มต้นที่สูง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ทำการศึกษาต่อเนื่องเกี่ยวกับเอนไซม์ที่เมมเบรนของเชื้อ *Paenibacillus azoreducens* ประกอบด้วย aldehyde dehydrogenase (ALDH) และ alcohol dehydrogenase (ADH) เพื่อให้เข้าใจกิจกรรมการผลิตกรดอะซิติกของเชื้อ

5.2.2 ทำการพัฒนาการปรับปรุงกิจกรรมการสร้างกรดอะซิติกในถังหมัก internal Venturi injector bioreactor ต้นแบบขนาด 100 ลิตร ให้มีประสิทธิภาพที่สูงขึ้น

5.2.3 การปรับสภาพเชื้อ *Paenibacillus azoreducens* ให้มีความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกในอัตราที่เร็วขึ้น เพื่อเหตุผลทางด้านต้นทุนของการผลิตที่ต่ำลง

บทที่ 6

สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 สรุปผลงานวิจัย

เชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสร้างกรด (spore-former acid producing bacteria) ที่คัดแยกออกมาได้ สามารถปรับตัวให้ต้านทานสภาพแวดล้อมที่รุนแรงในการหมักได้ โดยเฉพาะในสภาพที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดอะซิติกที่สูงได้ แบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ คือ *Paenibacillus azoreducens* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ในความเข้มข้นที่สูงในสภาพการหมักด้วยระบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous acetification process)

ข้อเด่นของการวิจัยนี้ คือ ความเป็นไปได้ในการผลิตกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้นสูง อีกทั้งเป็นรายงานแรก ที่รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus* มีความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกในสภาพการหมักที่ใช้กรดอะซิติก เริ่มต้นที่สูงด้วยระบบกึ่งต่อเนื่องได้ นอกจากนี้ยังมีข้อดีอีกสองประเด็น คือ การหมักด้วยเชื้อ *P. azoreducens* จะไม่มีการสร้างวุ้นเซลล์ลอสในระหว่างการผลิตกรดและไม่เกิด Over-oxidation ภายหลังจากที่การหมักเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งทั้งสองประเด็นนี้เป็นจุดด้อยที่เกิดขึ้นกับการใช้เชื้อ *Acetobacter aceti* ในการผลิต ดังนั้นเชื้อ *P. azoreducens* จึงจัดเป็นทางเลือกหนึ่งของการผลิตกรดอะซิติกซึ่งอาจมีผลโดยตรงต่อการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม ดังนั้นการดำเนินการศึกษา ต่อเนื่องในการพัฒนาเพิ่มอัตราในการผลิตกรดอะซิติกของเชื้อ *P. azoreducens* จึงน่าสนใจและจะดำเนินการต่อไป.

6.2 สรุปผลผลิตงานวิจัย

ผลงานวิจัย ได้ดำเนินการจัดทำต้นฉบับบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศในชื่อเรื่อง “Novel Strain of *Paenibacillus azoreducens*: Capability in Acetification Under High Initial Acetic Acid Concentration Processing”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- วราวุฒิ ครูต่ง พนิต เพ็ชรน่วม และ ประภาส ปิ่นวิเศษ. 2553. การผลิตน้ำส้มสายชูหมัก: การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อทดแทนการนำเข้า...สู่การยอมรับของภาคเอกชนไทย. วารสารวิจัยและนวัตกรรมเพื่ออุตสาหกรรมไทย. 1, 14-21.
- Abriouel, H., Franz, G.M.A.P., Omar, N.B., and Galvez, A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*. 35, 201-232.
- Arnold, S., Becker, T., Delgado, A., Emde, F., and Enekel, A. 2002. Optimizing high strength acetic acid bioprocess by cognitive methods in an unsteady state cultivation. *Journal of Biotechnology*. 97, 133-145.
- Ash, C., Farrow, J., Wallbanks, and Collins, M. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the gene *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters of Applied Microbiology*. 13, 202-206.
- Ash, C., Priest, F., and Collins, M. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 64, 253-260.
- Azuma, Y., Hosoyama, A., Matsutani, M., Furuya, N., Horikawa, H., Harada, T., Hirakawa, H., Kuhara, S., Matsushita, K., Fujita, N., and Shirai, M. 2009. Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Research*. 37, 5768-5783.
- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Bonilla-Venceslada, J.L., Álvarez-Caliz, C., and García-García, I. 2010. Influence of the final ethanol concentration on the acetification and production rate in the wine vinegar process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 85, 908-912.
- Choi, K., Park, C., Kim, S., Lyoo, W., Lee, S.H., and Lee, I. 2004. Polyvinyl alcohol degradation by *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 and *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508 in dyeing wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14, 1009-1013.
- Chung, Y.R., Kim, C.H., Hwang, I., and Chun, J. (2000). *Paenibacillus koreensis* sp.nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50, 1495-1500.
- de Ory, I., Romero, L.E., and Cantero, D. 2002. Optimum starting protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*. 52, 31-37.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- de Ory, I., Romero, L.E., and Cantero, D. 2004. Operation of semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*. 63, 39-45.
- de Souza, R., Meyer, J., Schoenfeld, R., de Costa, P.B., and Passaglia, L.M.P. 2014. Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with rice cropped in iron-stressed soils. *Annals of Microbiology*. 65, 951-964.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32, 1792-1797.
- Ewing, B., and Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*. 8, 186-194.
- Fregapane, G., Rubio-Fernandez, H., Nieto, J., and Salvador, M.D. 1999. Wine vinegar production using a noncommercial 100-litre bubble column reactor equipped with a novel type of dynamic sparger. *Biotechnology and Bioengineering*. 63, 141-146.
- Fregapane, G., Rubio-Fernandez, H., and Salvador, M.D. 2001. Influence of fermentation temperature on semi-continuous acetification for wine vinegar production. *European Food Research and Technology*. 213, 62-66.
- Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., and Yuan, Z.C. 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*. 15, 203. DOI 10.1186/s12934-016-0603-7
- Gullo, M., Verzelloni, E., and Canonico, M. 2014. Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. *Process Biochemistry*. 49, 1571-1579.
- Gullo, M., Zanichelli, G., Verzelloni, E., Lemmetti, F., and Giudici, P. 2016. Feasible acetic acid fermentations of alcoholic and sugary substrates in combined operation mode. *Process Biochemistry*. 51, 1129-1139.
- Holl, F.B., and Chanway, C.P. 1992. Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Canadian Journal of Microbiology*. 38, 303-308.
- Huang, E., and Yousef, A.E. 2015. Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with n-terminal acetylation by *Paenibacillus polymyxa*. *Microbiology Research*. 181, 15-21.
- Kim, J.M., Lee, S.H., Lee, S.H., Choi, E.J., and Jeon, C.O. 2013. *Paenibacillus hordei* sp. nov., isolated from naked barley in Korea. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 103, 3-9.
- Krusong, W., Vichitraka, A., and Pornpakdeewattana, S. 2007. Luffa sponge as supporting material of *Acetobacter aceti* WK for corn vinegar production in semi-continuous process. *KMITL Science Journal*. 7, 63-68.

- Krusong, W., Petch-nom, P., and Pinviset, P. 2010. Semi-continuous production process of corn vinegar in stirred tank reactor using fixation of *Acetobacter aceti* WK on surface of loofa sponge. *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 44, 201-207.
- Krusong, W., and Vichitraka, A. 2011. An air-lift acetifier with mash recycling system for corn vinegar production by adsorbed cells of *Acetobacter aceti* WK on surface of loofa sponge. *Proceedings of the 2011 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science (ICBFS2011)*, 1-3 April 2011, Bali Island, Indonesia. (CD-ROM).
- Krusong, W., and Tantratjan, S. 2014. Acetification of rice wine by *Acetobacter aceti* using loofa sponge in a low-cost reciprocating shaker. *Journal of Applied Microbiology*. 117, 1348-1357.
- Krusong, W., Pornpukdeewatana, S., Kerdpi boon, S., and Tantratjan, S. 2014. Prediction of influence of stepwise increment of initial acetic acid concentration in charging medium on acetification rate of semi-continuous process by artificial neural network. *LWT - Food Science and Technology*. 56, 383-389.
- Krusong, W., Yaiyen, S., and Pornpukdeewatana, S. 2015. Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*. 118, 629-640.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35, 1547-1549.
- Lasko, D.R., Zamboni, N., and Sauer, U. 2001. Bacterial response to acetate challenge: a comparison of tolerance among species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54, 243-247.
- Liang, T.W., and Wang, S.L. 2015. Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: Production, isolation, structure, and bioactivities. *Marine drugs*. 13, 1847-1863. Doi:10.3390/md13041847.
- Liu, J., Luo, j., Ye, H., and Zeng, X. 2012. Preparation, antioxidant, and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Food Chemistry and Toxicology*. 50, 767-772.
- Liu, Y., Zhao, R., Wang, R., Yao, S., Zhai, L., Zhang, X., Chen, C., Cao, Y., Xu, T., Ge, Y., Zhao, J., and Cheng, C. 2016. *Paenibacillus chinensis* sp. nov., isolated from maize (*Zea mays* L.) seeds. *Antonie van Leeuwenhoek*. 109, 207-213.
- Lu, S.F., Lee, F.L., and Chen, H.K. 1999. A thermotolerant and high acetic acid-producing bacterium *Acetobacter* sp.I14-2. *Journal of Applied Microbiology*. 86, 55-62.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Maestre, O., Santos-Dueñas, I.M., Peinado, R., Jiménez-Ot, C., García-García, I., and Mauricio, J.C. 2008. Changes in amino acid composition during wine vinegar production in a fully automatic pilot acetator. *Process Biochemistry*. 43, 803-807.
- Marwoto, B., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N. 2004. Metabolic analysis of acetate accumulation during xylose consumption by *Paenibacillus polymyxa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64, 112-119.
- Mounir, M., Fauconnier, M.L., Afechtal, M., Thonart, P., Alaoui, M.I., and Delvigne, F. 2018. Aroma profile of pilot plant-scale produced fruit vinegar using a thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strain isolated from Moroccan cactus. *Acetic Acid Bacteria*. 7, 7312.
- Nakashimada, Y., Kanai, K., and Nishio, N. 1998. Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2,3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. *Biotechnology Letter*. 20, 1133-1138.
- Ndoye, B., Lebecque, S., Dubois-Dauphin, R., Tounkara, L., Guiro, A.-T., Kere, C., Diawara, B., and Thonart, P. 2006. Thermoresistant properties of acetic acid bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 916-923.
- Ndoye, B., Lebecque, S., Destain, J., Guiro, A.T., and Thonart, P. 2007. A new pilot scale acetifier designed for vinegar production in Sub-Saharan Africa. *Process Biochemistry*. 42, 1561-1565.
DOI: [10.1016/j.procbio.2007.08.002](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.08.002)
- Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*. 41, 711-753.
- Priest, F.G., Goodfellow, M., and Todd, C. 1988. A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*. 134, 1847-1882.
- Qi, Z., Yang, H., Xia, X., Xin, Y., Zhang, L., Wang, W., and Yu, X. 2013. A protocol for optimization vinegar fermentation according to the ratio of oxygen consumption versus acid yield. *Journal of Food Engineering*. 116, 304-309.
- Ramya, M., Anusha, B., and Kalavathy. 2008. Decolorization and biodegradation of indigo carmine by textile soil isolate *Paenibacillus larvae*. *Biodegradation*. 19, 283-291.
- Raj, A., Kumar, S., Haq, I., and Singh, S.K. 2014. Bioremediation and toxicity reduction in pulp and paper mill effluent by newly isolated ligninolytic *Paenibacillus* sp. *Ecological Engineering*. 71, 355-362.
- Raza, W., Makeen, K., Wang, Y., Xu, Y., and Qirong, S. 2011. Optimization, purification, characterization and

- antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. *Bioresource Technology*. 102, 6095-6103.
- Saxena, N., Pore, S., Arora, P., Kapse, N., Engineer, A., and Ranade, D.R. 2015. Cultivable bacterial flora of Indian oil reservoir: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *Biologia*. 70, 1-10.
- Sacki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N., and Adachi, O. 1997. Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 61, 138-145.
- Sheera, T., and Usharani, P. 2013. Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the growth of maize (*Zea mays* L.). *Golden Research Thoughts*. 3, 629-640.
- Singh, A.K., Ghodke, I., and Chhatpar, H.S. 2009. Pesticide tolerance of *Paenibacillus* sp. D1 and its chitinase. *Journal of Environmental Management*. 91, 358-362.
- Slepecky, R., and Hemphill, E. 1992. The genus *Bacillus*-nonmedical. In: Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H. (eds) *The prokaryotes*. Springer-Verlag, New York, pp 1663-1696.
- Soo Park, Y., Ohtake, H., Fukaya, M., Kawamura, Y., and Toda, K. 1989. Effects of dissolved oxygen and acetic acid concentrations on acetic acid production in continuous culture of *Acetobacter aceti*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 68, 96-101.
- Tamura, K., and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10, 512-526.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 101, 11030-11035.
- Tang, Q.Y., Yang, N., Wang, J., Xie, Y.Q., Ren, B., Zhou, Y.G., Gu, M.Y., Mao, J., Li, W.J., Shi, Y.H., and Zhang, L.X. 2011. *Paenibacillus algorifonticola* sp.nov., isolated from a cold spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61, 2167-2172.
- Torija, J.M., Mateo, E., Guillamón, J.M., and Mas, A. 2010. Design and optimization of TaqMan-MGB probes for the identification and quantification of acetic acid bacteria. *Food Microbiology*. 27, 257-265.
- Vas, G., and Vékey, K. 2004. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*. 39, 233-254.
- von der Weid, I.A., Paiva, E., Norega, A., van Elsas, J.D., and Seldin, L. 2000. Diversity of *Paenibacillus*

- polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. *Research in Microbiology*. 151, 369-381.
- Weon-Taek, S., Kahng, G.G., Nam, S.H., Choi, S.D., Suh, H.H., Kim, S.W., and Park, Y.H. 1999. Isolation and characterization of a novel exopolysaccharide-producing *Paenibacillus* sp. WN9 KCTC 8951P. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9, 820-825.
- Yadav, A.N., Sachan, S.G., Verma, P., and Saxena, A.K. 2016. Bioprospecting of plant growth promoting psychrotrophic bacilli from the cold desert of north western indian Himalayas. *Indian Journal of Experimental hBiology*. 54, 142-150.
- Yamada, Y., and Yukphan, P. 2008. Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 125, 15-24.
- Yao, R., Wang, R., Wang, D., Su, J., Zheng, S.X., and Wang, G.J. 2014. *Paenibacillus selenitireducens* sp.nov., a selenite-reducing bacterium isolated from a selenium mineral soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64, 805-811.
- Yuan, Y., Feng, F., Chen, L., Yao, Q., and Chen, K. 2013. Directional isolation of ethanol-tolerant acetic acid bacteria from industrial fermented vinegar. *European Food Research and Technology*. 236, 573-578.
- Zeigler, D.R. 2013. The family Paenibacillaceae. In. *Strain Catalog and Reference Columbus: Bacillus Genetic Stock Center*, pp. 1-32.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย

สัญญาเลขที่ 2562-01-07001

โครงการ เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ *Paenibacillus* spp. ที่ทนกรดอะซิติกความเข้มข้นสูงเพื่อ
กระบวนการผลิตกรดอะซิติก

รายงานสรุปการเงินรอบ.....12.....เดือน

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ผู้รับทุน...ศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ครูสง.....
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่.....1 ตุลาคม 2561.....ถึงวันที่.....30 กันยายน 2562.....

สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้บังคับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน

หมวดค่าใช้จ่าย	รายจ่ายสะสมจากรายงานครั้งก่อน 1	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน 2	รวมรายจ่ายสะสมจนถึงปัจจุบัน 3 = 1 + 2	งบประมาณตั้งไว้ (สะสมจนถึงปัจจุบัน) 4	งบประมาณคงเหลือ (หรือเกิน) 5 = 4 - 3
งบบุคลากร : ค่าจ้างชั่วคราว					-
งบดำเนินงาน					
ค่าตอบแทน					-
ค่าใช้สอย	4,173	3,005	7,178	16,000	8,822
ค่าวัสดุ	34,490	42,326.67	76,816.67	64,000	(12,816.67)
ค่าสาธารณูปโภค					-
งบลงทุน : ค่าครุภัณฑ์					-
รวม	38,663	45,331.67	83,994.67	80,000	(3,994.67)

จำนวนเงินที่ได้รับ รายจ่าย และจำนวนเงินคงเหลือ (ให้รายงานแบบสะสมทุกงวด)

งวดที่ / รายการ	รายรับ (บาท)		รายจ่าย (บาท)	คงเหลือ (บาท)
	จำนวนเงินที่ได้รับ	วันที่ได้รับ		
1	88,000	7 ธ.ค. 2561	38,663	29,337
2	12,000	2 ส.ค. 2562	45,331.67	(3,994.67)
ดอกเบี๋ยรับครั้งที่ 1	24.19	31 ธ.ค. 2561		
ดอกเบี๋ยรับครั้งที่ 2	116.04	30 มิ.ย. 2562		
รายได้*				
ฯลฯ				
รวมจำนวนเงินที่ได้รับทั้งสิ้น	80,000 (6)		รวมรายจ่ายทั้งสิ้น 83,994.67 (7)	A

จำนวนเงินคงเหลือ A = (6) - (7) ...80,000 - 83,994.67 = (3,994.67)...บาท

ประกอบด้วย เงินฝากธนาคาร.....บาท เงินสดในมือบาท

.....
ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

.....
ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล ดร. วราวุฒิ ครูส่ง

ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
Ph.D	Food Science	University of the Philippines at Los Banos	2533
วท.ม	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2528
วท.บ	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2525

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

- (1) การพัฒนากระบวนการหมักน้ำส้มสายชู
- (2) จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร
- (3) การยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2555	รางวัลเทคโนโลยีเครื่องจักรกลยอดเยี่ยม รางวัลที่ 1 สาขาเครื่องจักรกลการผลิต ในการประกวดรางวัลเทคโนโลยีเครื่องจักรกลยอดเยี่ยม ประจำปี 2554 (ถึงหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก)	กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
2551	Professional Award ชนะเลิศอันดับสาม โครงการ IRPUS	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
2550	Best iTAP Partnership Award	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย (iTAP) ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี (TMC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ (ย้อนหลัง 3 ปี)

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2561-63	น้ำส้มสายชู : การพัฒนากระบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์และการประยุกต์ใช้	ทุนศาสตราจารย์วิจัย กองทุนวิจัย สจล.
2560-63	การปรับสภาพหัวเชื้อแบคทีเรียที่ทนกรดสูงและพัฒนากระบวนการสร้างกรดอะซิติกในสภาพอุณหภูมิสูง	พวอ. สกว.
2560-61	การพัฒนาเครื่องต้มเบียร์สุภาพที่มีปริมาณแอลกอฮอล์-คาร์โบไฮเดรตต่ำและเสริมเชื้อยีสรีโอบิติก	Talent Mobility สกอ.

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

- Krusong, W., Sriphochanart, W., Suwanpanich, R., Mekkerdchoo, O., Sriprom, P., Wipatanawin, A., and Massa, S.** 2019. Healthy dried baby corn silk vinegar production and determination of its main organic volatiles containing antimicrobial activity. *LWT-Food Science and Technology*. (In Press).
- Krusong, W., Pothimon, R. and Vichitraka, A.** 2019. Inhibitory impact of vapor-phase ethanol on conidia germination and mycelial growth of *Aspergillus fumigatus* on bread. *Food Control*, 95, 165-169. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.010>
- Tantratian, S., Balmuang, N., and Krusong, W.** 2019. Phenolic enrichment of Ma-Kieng seed extract using absorbent and this enriched extract application for safety control of fresh-cut cantaloupe. *LWT-Food Science and Technology* 106, 105-122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.049>
- Palakawong Na Ayuthaya, P., Charoenrat, T., Krusong, W. and Pornpukdeewattana, S.** 2019. Repeated cultures of *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava processing waste hydrolysis for bioethanol production. *3 Biotech*. 9:76 <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1607-x>
- Changsawake, K., Krusong, W., Laosinwattana, C. and Teerarak, M.** 2017. Retarding changes of postharvest qualities of sweet basil (*Ocimum basilicum* Linn.) by vapor-phase vinegar. *Journal of Herbs, Spices and Medical Plants*. DOI: 10.1080/10496475.2017.1329176.
- Pornpukdeewattana, S., Kerdpiboon, S., Jindaprasert, A., Pandee, P., Teerarak, M. and Krusong, W.** 2017. Upland rice vinegar vapor inhibits spore germination, hyphal growth and aflatoxin formation in *Aspergillus flavus* on maize grains. *Food Control*. 71, 88-93.
- Krusong, W., Kerdpiboon, S., Pornpukdeewatana, P. and Jindaprasert, A.** 2016. Luffa sponge offsets the negative effects of aeration on bacterial cellulose production. *Journal of Applied Microbiology*. 121, 1665-1672.
- Krusong, W., Pornpukdeewatana, S. and Teerarak, M.** 2016. Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* on coriander leaves to liquid- and vapor-phase ethanol. *FEMS Microbiology Letters*. 363. doi: 10.1093/femsle/fnw072.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Krusong, W.,** Kerdpi boon, S., Jindaprasert, A., Yaiyen, S., Pornpukdeewatana, S. and Tantratian, S. 2015. Influence of calcium chloride in the high temperature acetification by strain *Acetobacter aceti* WK for vinegar. *Journal of Applied Microbiology*. 119, 1291-1300.
- Krusong, W.,** Jindaprasert, A., Laosinwattana, C, and Teerarak, M. 2015. Baby-corn fermented vinegar and its vapour, control postharvest decay in strawberries. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 43, 193-203.
- Krusong, W.,** Teerarak, M., and Laosinwattana, C. 2015. Liquid and vapor-phase vinegar reduces *Klebsiella pneumoniae* on fresh coriander. *Food Control*. 50, 502-508.
- Krusong, W.,** Yaiyen, S., and Pornpukdeewatana, S. 2015. Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*. 118, 629-640.
- Krusong, W.** and Tantratian, S. 2014. Acetification of rice wine by *Acetobacter aceti* using loofa sponge in a low-cost reciprocating shaker. *Journal of Applied Microbiology*. 117, 1348-1357.
- Krusong, W.,** Pornpukdeewatana, S., Kerdpi boon, S., and Tantratian, S. 2014. Prediction of influence of stepwise increment of initial acetic acid concentration in charging medium on acetification rate of semicontinuous process by artificial neural network. *LWT - Food Science and Technology*. 56, 383-389.
- การเสนอผลงานวิชาการ**
- Yingyong, K., Jindaprasert, A., Sriphochanart, W., and **Krusong, W.** 2018. Effect of lemongrass oil nano-emulsion on inhibition of *Escherichia coli*: An in vitro study. The 20th Food Innovation Asia Conference 2018 (FIAC 2018). Creative Food for Future and Sustainability 14-16 June 2018.
- Laeman, A., Jindaprasert, A., Sriphochanart, W., and **Krusong, W.** 2018. Effect of vapor phase-upland rice vinegar, pure acetic acid and isoamylalcohol on conidia survival and mycelial growth of *Aspergillus fumigatus* in vitro. The 20th Food Innovation Asia Conference 2018 (FIAC 2018) Creative Food for Future and Sustainability 14-16 June 2018.
- Chadseesuwana, U., Wipatanawin, A., and **Krusong, W.** 2017. Improving the quality of okara with *Aspergillus oryzae* via solid-state fermentation. The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference November 23-25, 2017 Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand.
- Jinaprasert, A., Morklang, K., and **Krusong, W.** 2017. Effects of distilled vinegar and potassium permanganate on reduction of *Salmonella* Typhimurium on spring onion. The 19th Food Innovation Asia Conference 2017 (FIAC 2017). Innovative Food Science and Technology For Mankind: Empowering Research for Health and Aging Society, BITEC, 15-17 June 2017.
- Pothimon, R. and **Krusong, W.** 2016. In vitro susceptibility of *penicillium* spp. to vapor phase-ethanol and vinegar. Food Innovation Asia Conference 2016 (FIAC 2016). Food Research and Innovation for Sustainable Global Prosperity, BITEC, 16-18 June 2016.
- Krusong, W.,** Kerdpi boon, S., Jindaprasert, A., Yaiyen, S., and Pornpukdeewatana, S. 2016. Changes in lipid, membrane-bound enzyme of acetic-acid bacteria under high initial acetic acid acetification process. International Conference on Beneficial

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Microbes (ICOBM 2016), Duangjitt Resort & Spa, Patong Beach, Phuket, Thailand, 31 May-2 June 2016. (Oral presentation).
 Jindaprasert, A., Pornpukdeewatana, S., Kerdpi boon, S., and Krusong, W. 2016. Improvement of α -amylase and glucoamylase production from *Amylomyces* spp. using metal ions in wheat bran. International Conference on Beneficial Microbes (ICOBM 2016), Duangjitt Resort & Spa, Patong Beach, Phuket, Thailand, 31 May-2 June 2016.

ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะ หรือ อื่นๆ)

การยื่นจดสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)

คำขอรับสิทธิบัตรเลขที่ 0801005225 ในนาม “สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง”
 ยื่นเมื่อวันที่ 13 ตุลาคม พ.ศ. 2551

เปลี่ยนมาขึ้นจดอนุสิทธิบัตร เรื่อง “ระบบผลิตน้ำส้มสายชูด้วยตัวผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศภายในถังหมัก (Internal Venturi Ejector System)” เลขที่คำขอ : 1403001128 วันที่ขอ : 18 ก.ย. 2557

ได้รับเลขที่ทรัพย์สินทางปัญญา : 12907 วันที่ออกให้ : 26 ก.ค. 2560 วันหมดอายุ : 17 ก.ย. 2563

กรรมวิธีการทำให้วุ้นเซลลูโลสใส

คำขอรับสิทธิบัตรเลขที่ 0901005777 ในนาม “สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง”
 ยื่นเมื่อวันที่ 22 ธันวาคม พ.ศ. 2552

กรรมวิธีการผลิตวุ้นเซลลูโลสเสริมกลิ่นและรสชาติ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกรรมวิธีดังกล่าว

คำขอรับสิทธิบัตรเลขที่ 1703000552 ในนาม “สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง”
 ยื่นเมื่อวันที่ 31 มีนาคม พ.ศ. 2560

อื่นๆ

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง “กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)”

เลขที่ LA 53/01 ลงวันที่ 4 มกราคม พ.ศ. 2553

ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท ไฮคิวผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง “กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)”

เลขที่ LA 54/01 ลงวันที่ 23 กันยายน พ.ศ. 2554

ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท วินก้าไทย จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง “กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)”

เลขที่ LA 55/01 ลงวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2555

ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท ปรีนเซส ฟู้ดส์ จำกัด

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง “กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)”

เลขที่ LA 60/02 ลงวันที่ 21 เมษายน พ.ศ. 2560

ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท ไทยออแกนิกฟู้ด จำกัด

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง “ถังหมักและกระบวนการหมักเพื่อการผลิตน้ำส้มสายชูจากโหมข้าวโพด”

เลขที่ LA 62/01 ลงวันที่ 29 มีนาคม พ.ศ. 2562

ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท ปรีนเซส ฟู้ดส์ จำกัด

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล

ดร.วิรามศรี ศรีทองนารถ

ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	เคมี	มหาวิทยาลัยศิลปากร	2542
วท.ม.	ชีวเคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2546
วศ.ด.	วิศวกรรมเคมี	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	2552

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

- (1) Lactic acid fermentation
- (2) Enzyme technology

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2552	รางวัลวิทยานิพนธ์ (ปริญญาเอก) ระดับชมเชย	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ (ย้อนหลัง 3 ปี)

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2551	ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์จากมูลนิธิการศึกษาเขต 100 ปี ปีการศึกษา 2551	มูลนิธิการศึกษาเขต 100 ปี
2555	ทุนสนับสนุนการวิจัยปริญญาโท ทุนโครงการสร้างปัญญาวิทย์ ผลิตนักเทคโนโลยี (YSTP) ปีการศึกษา 2555 เรื่อง การพัฒนาอนุภาคทองคำระดับนาโนที่ปรับปรุงพื้นผิวด้วยหมู่ฟังก์ชันโบรอนเพื่อใช้เป็นแคตลิสต์เอนไซม์ เซนเซอร์สำหรับตรวจวิเคราะห์ฟลูออไรด์ในน้ำ	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

Sriphochanart, W., Skolpap, W., Scharer, J.M., Moo-Young, M., and Douglas, P.L. 2011. Effect of amino acid requirements on the growth and lactic acid production of *Pediococcus acidilactici* culture. African Journal of Microbiology Research. 5, 3815-3822.

Sriphochanart, W., and Skolpap, W. 2011. The use of selected Lactic acid bacteria starter cultures for improved Thai sausage fermentation. Journal of Food Processing and Preservation, 35, 291-298.

Sriphochanart, W., and Skolpap, W. 2010. Characterization of proteolytic effect of lactic acid bacteria starter cultures on Thai fermented sausages. Food Biotechnology, 24, 293-311.

Prousoontorn, M.H., Jongmeevasana, P., Sriphochanart, W., and Pongsawasdi, P. 2008. Development of carbendazim and carbaryl detection method using immobilized cyclodextrin in competitive tracer encapsulation assay. Journal of Biotechnology. 136, 751-752.

การเสนอผลงานวิชาการ

Laorjipinyo, T., Swetwathana, A., Jindaprasert, A., **Sriphochanart, W.**, Kerdpiboon, S., Vattanamane, S. Effect of sodium lactate on inhibition of *Clostridium perfringens* spores in sous-vide model (SVM) broth. The 18th Food Innovation Asia Conference 2016 (FIAC 2016), Food Research and Innovation for Sustainable Global Prosperity, 16-18 June 2016. Bangkok, Thailand.

Tipayaklairaj, W., Mhoophueng, S., **Sriphochanart, W.**, Yaiyen, S. The optimization of β -cyclodextrin production from gelatinized cassava starch. The 6th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (FerVAAP 2015). June 29th-31th, 2015. Khonkhen, Thailand.

Sriphochanart, W., and Skolpap, W. Thai fermented sausage production using selected Lactic acid bacteria as starter cultures. 13th Regional Symposium on Chemical Engineering, Nanyang Technological University, Singapore, December 3-5, (2009).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Novel Strain of *Paenibacillus azoreducens*: Capability in Acetification Under High Initial Acetic Acid Concentration Processing

Warawut Krusong ^{a,*}, Assanee Vichitraka ^a, Wiramsri Sriphochanart ^a, Soisuda Pornpukdeewatana ^a, Ruttipron Pothimon ^a, Salvatore La China ^b, Maria Gullo ^b, and Anthony Keith Thompson ^c

^a Faculty of Agro-Industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

^b Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Italy

^c Visiting Professor at King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand, formally Professor at Cranfield University, UK

*Corresponding author. Tel.: +66 2 3298000 ext. 7278; Fax: +66 2 3298526

E-mail: warawut.kr@kmitl.ac.th (W.Krusong)

Abstract

Acid producing bacteria which cause spoilage of alcoholic beverages during the fermentation process, were isolated from saccharified upland rice during rice wine processing. An endospore-forming bacterium designated as strain P8, was the highest acid producing strain both under high initial acetic acid concentration and during subsequent acetification processing.

Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that strain P8 was affiliated to the genus *Paenibacillus*, most closely related to *Paenibacillus azoreducens* with 99.855 % similarity.

Analysis of samples, using gas chromatography-mass spectrometry, confirmed that acetic acid could be produced by *P. azoreducens*. When the effects of *P. azoreducens* in semi-continuous production was examined, it was shown that acetic acid in the range of 69±0.5 to 79±0.2 g L⁻¹ was produced during nine consecutive cycles with the average acetification rate at 5.7 g L⁻¹ week⁻¹ and bio-transformation yield at 90.1%. In addition, both no cellulosic film formation and no over-oxidation of acetic acid were observed. Among 40 volatile compounds associated with the fermentation process, 20 were similar to those found in vinegar produced by *Acetobacter aceti* WK (37 total volatile components) of which eight were the main components that were common to vinegar product by both *P. azoreducens* and *A. aceti*. Our study showed that this contaminating organism could have positive as well as negative effects and bio-acetic acid production could be successfully produced from *P. azoreducens*, which may be a useful bioproduct for future commercial production.

Keywords: *Paenibacillus azoreducens*, bio-acetic acid, acetification, high acetic acid concentration, semi-continuous, acid-tolerant strain

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Introduction

The Gram-positive aerobic endospore-forming bacteria *Paenibacillus* comprises over 30 species was created to accommodate the former “group 3” of the genus *Bacillus* (Ash et al., 1993). In Latin *paene* means almost, and therefore the *Paenibacillus* is almost a *Bacillus*. Most *Paenibacillus* are aerobic or facultatively anaerobic, endospore-forming, rod-shaped bacteria and motile by means of peritrichous flagella (Kim et al., 2013; Liu et al., 2016). Currently, *Paenibacillus* is one of eight genera included in the family *Paenibacillaceae* - *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Cohnella*, *Fontibacillus*, *Oxalophagus*, *Saccharibacillus*, and *Thermobacillus* (Zeigler, 2013).

Many *Paenibacillus* species inhabit different environmental niches including soils (Yao et al., 2014), roots, the rhizosphere of various crop plants (Holl and Chanway, 1992; von der Weid et al., 2000; Raza et al., 2011), water springs (Tang et al., 2011) and naked barley (Kim et al., 2013). In our study, *Paenibacillus* was isolated from contaminated saccharified upland rice during rice wine making before subsequently being used in acetification processing.

Some *Paenibacillus* have economic importance for their use in industry (Priest 1977; Slepecky and Hemphill, 1992; Weon-Taek et al., 1999; Chung et al., 2000), especially the production of a variety of enzymes with potential applications in manufacturing for detergents, food, textiles, paper, biofuel, antimicrobials, exo-polysaccharides with relevance in medicine and bioremediation. They also have potential in agricultural in improving crop growth directly via biological nitrogen fixation, phosphate solubilization, production of the phytohormone indole-3-acetic acid and the release of siderophores that enable iron acquisition (Grady et al., 2016). Also, Marwoto et al. (2004) showed that *P. polymyxa* ATCC 12321 can produce acetic acid from xylose rather than from glucose.

The aim was therefore (1) to isolate the spore former-acid producing bacterial strains that contaminate upland rice during the saccharification process; (2) to investigate the production of acetic acid via acetification by the selected isolate strain of *Paenibacillus*; (3) to compare of acetification between *P. azoreducens* and *Acetobacter aceti* WK (our high acid-tolerant acetic acid bacteria) as well as the volatile components produced in the products. The high initial acetic acid concentration process was used in this study.

Materials and Methods

Strains, medium and acetification conditions

Acetobacter aceti WK- is the high acid-tolerant acetic acid bacterium used in the experiments, which had been isolated and screened from pineapple fruit over a ten-year period. In order to develop its acid tolerance the strain of *A. aceti* that was selectively adapted to have high acetic acid tolerance at 30 ± 1 °C by stepwise elevations of acetic acid (AA) content from 10 g L⁻¹ (at the start) to 25 ± 1 , 45 ± 1 and 65 ± 1 g L⁻¹ (at the end) over a six-year period (Krusong and Tantratian, 2014). The AAB starter was prepared by cultivation in a complex medium (g per liter of water; Krusong et al., 2007): glucose 50, yeast extract 5, MgSO₄·7H₂O 0.2 and (NH₄)₂HPO₄ 0.5) under aeration at 4.5 L min⁻¹ for 7 days at 30 ± 1 °C (Krusong et al., 2007).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Upland rice vinegar, containing 8% acetic acid, was obtained from the Laboratory of Fermentation Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand. It was used in the adjustment of AA content during standardization of the fermentation medium in the acetification process by the *A. aceti* strain, as described above, and the selected isolate of spore former-acid producing bacteria.

Rice wine with an ethanol content of 90 ± 0.2 g L⁻¹ and acidity of 1.8 ± 0.2 g L⁻¹ was used in the adjustment of ethanol during standardization of the fermentation medium of the acetification process.

Acetification condition - according to the high initial acetic acid concentration (HAA_i) process (Krusong et al., 2014), the medium was standardized to a total solute concentration of 80 g L⁻¹ by adjusting the ethanol and AA contents to 35 ± 1 g L⁻¹ and 45 ± 1 g L⁻¹, respectively. The following complex nutrients (see above) were added to the medium. Due to the antimicrobial effect of AA, contaminant microbes could be destroyed, therefore, no sterilization of the medium was conducted.

Screening of spore former-acid producing bacteria

Screening of spore former-acid producing bacteria from 30 samples of contaminated or rotten saccharified rice was conducted. Samples were diluted with 1% peptone water before conducting the pour plate technique on sterile *Paenibacillus*-basal agar medium consisting of (g per liter of water) glucose 20, yeast extract 5, tryptone 5, (NH₄)₂HPO₄ 7, MgSO₄·7H₂O 0.25, CaCO₃ 10 and agar 15 (modified from Nakashimada et al., 2004). After incubation at 35-37 °C for 3-5 days, the acid producing colony, which formed a clear zone on the agar medium, was picked up and streaked on the agar medium plate and repeated three times. All isolates of acid producing bacteria were examined for their spore by spore staining test. The spore former-acid producing bacteria were kept in *Paenibacillus*-basal medium agar slant at 35-37 °C for the subsequent study.

Selection of spore former-acid producing bacteria for acetic acid production under high initial acetic acid concentration process

All isolates of spore former-acid producing bacteria (as above) were cultivated individually in acetification medium supplemented with the complex medium (see above) which was adjusted to a total concentration of 80 g L⁻¹ (as mentioned above in acetification condition) in a 1 L Duran bottle with 500 mL as described by Krusong et al., (2014; 2015). The aeration was controlled at a constant rate of 4 L min⁻¹. The isolate, which produced the highest amount of acetic acid, was selected and used for the further investigation. Simultaneously, the isolated cells, which found to be spore-forming and rod-shaped, were further investigated by phylogenetic analysis.

16S sequencing and phylogenetic analysis of screened spore former-acid producing strain

To determine the phylogenetic position of the selected strain, the 16S rRNA sequencing was performed. The gDNA extraction, amplification and sequencing of 16S rRNA gene was

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

performed by MacroGen Inc. company, based on their procedures. The sequence was trimmed, removing low quality bases, using Phred v 0.071220.c and assembled using Phrap v 1.090518 (Ewing and Green, 1998). The dataset was structured by downloading a total of 20 16S sequences of *Paenibacillus* strains from NCBI 16S rRNA databases, selecting the strains isolated in food matrices. The 16S sequences were aligned using Muscle v3.8.31 (Edgar, 2004). Resulting alignment was imported in MegaX (Kumar et al., 2018) and trimmed in order to obtain sequences with the same length. Trimmed alignment was used to generate a maximum-likelihood (ML) phylogenetic tree, applying the Tamura-Nei evolutionary model (Tamura and Nei, 1993), setting a discrete gamma distribution to model evolutionary rate differences among sites. The ML phylogenetic tree was computed using 1000 replicates. The alignment was also used to calculate the phylogenetic distant matrix.

Comparison of acetification performance and volatile components produced between Paenibacillus azoreducens and Acetobacter aceti WK under high initial acetic acid concentrations

The acetification condition for both *P. azoreducens* and *A. aceti* was prepared (see above) in a 100 L internal Venturi injector bioreactor (as reported in our previous study; Krusong et al., 2015) which comprised a stainless steel tank 1.00 m high and 0.40 m internal diameter that had a maximum working volume of 75 L. The medium was recycled using a centrifugal pump (Grundfos Ltd., Bangkok, Thailand), filtered and entrained. Well-compressed air was introduced into the medium at the injector nozzle (Mazzei Injector Com., LLC, Bakersfield, CA, USA) at 7.25-14.5 psi creating a plentiful amount of fine air bubbles in the bioreactor.

There are two phases in the initiation of the acetification - start up and operational. The first phase served for the adaptation of the culture in the new environment after inoculation of the culture into the medium. It was started with 25 L of working volume of the bioreactor at 7.25 psi of air (Krusong et al., 2015). The end of this phase occurred when the ethanol content reached 5 g L⁻¹ or less (Fregapane et al., 2001; de Ory et al., 2004). The second phase was started immediately by adding a volume of fresh medium (with adjustment of the composition to TC 80±1 g L⁻¹ and the addition of the complex medium, see above) to make up the medium volume to 75 L at 14.5 psi of air (Krusong et al., 2015). Acetification was judged to be complete when the remaining ethanol content in the medium had fallen to less than 5 g L⁻¹. The acetification performance of *P. azoreducens* and *A. aceti* were compared in both phases. In addition, the over-oxidation of both strain was tested after the ethanol content reached 0 g L⁻¹ by extending acetification period under the same rate of aeration supply. The reduction of acetic acid was monitored and implied as the over-oxidation property.

For determination of volatiles components in the product, samples was taken at the end of the operational phase of acetification by both *P. azoreducens* and *A. aceti* and analyzed qualitatively using GC-MS.

Semi-continuous acetification by Paenibacillus azoreducens

Nine cycles of acetification using *P. azoreducens* were run with a high initial acetic acid process (80 g L⁻¹ of total concentration consisting of 45 g L⁻¹ AA and 35 g L⁻¹ ethanol) in 100 L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

internal Venturi injector bioreactor while recording acetification rate called as ETA and biotransformation yield. ETA measures the rate of AA production and is calculated as the difference between the final and initial acidities during each acetification cycle. Biotransformation measures the percentage of ethanol that is converted to AA (Fregapane et al. 2001; de Ory et al., 2004; Krusong et al., 2015). The means of the calculated values of these two parameters were recorded for each cycle along with the cell biomass in form of cell dried weight (CDW) values.

Analytical methods

Acetic acid and ethanol contents during acetification were analyzed using GC-MS (Thermo Scientific Trace GC Ultra coupled to an ISQ Single Quadrupole Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). The DB-wax column (length 30 m, Pressure 6.76 psi, Flow 1.0 mL min⁻¹) was used with an inlet temperature of 250 °C and with splitless injection of 75 mL min⁻¹. Helium gas was employed as the carrier at 1.2 mL min⁻¹. Samples, were introduced and maintained at 40 °C for 5 min. The temperature increment was 5 °C min⁻¹ to 120 °C for AA or was 5 °C min⁻¹ to 90 °C for ethanol, and this was then held constant for 10 min and 3 min, respectively. Identification of the AA or ethanol was based on retention times compared with the Wiley, 275.L data library for the GC-MS system. Standard curve of AA and ethanol was carried out and used for concentration evaluation.

The cell biomass in terms of CDW in each acetification cycle was measured from the absorbance at 660 nm with a spectrophotometer (GENESYS 10VIS). The sample was diluted to an OD_{660nm} value between 0.3 and 0.8 and converted to CDW through a linear correlation standard curve of *P. azoreducens*, one DO₆₆₀ was almost equivalent to 0.3 g L⁻¹. The resulting CDW was determined in the same way as that in the fermentation medium (Krusong and Tantratian, 2014).

The volatile components of the acetification products produced by *P. azoreducens* and *A. aceti* were removed by solid phase micro-extraction (SPME) (modified from Vas and Vékey, 2004) and measured using GC-MS. First, 5 mL of the sample was placed in a 25 mL glass bottle leaving a 20 mL headspace volume. To this was added 3 g of solid NaCl and the bottle was sealed with a septum cap (Stableflex PDMS/DVB for SPME fiber size 60 µm; Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA). After 60 min at 37°C, to allow for extraction, the components were analyzed using GC-MS (as above). Samples were introduced and maintained at 40 °C for 5 min. The temperature increment was 5°C min⁻¹ to 230 °C and was then held constant for 5 min. For MS determination, an electron ionization mode was employed with ion source temperature of 230 °C, scan mass range of 35-300 amu, and MS transfer line at 240 °C with 0 min solvent delay time. Identification of the volatile components was based on retention times and mass spectra fragmentation patterns and qualitatively compared with the Wiley, 275.L data library for the GC-MS system.

Statistical analyses

Measurements were replicated three times and their means are reported together with appropriate standard deviations (±Standard Deviation).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Results

Screening and selection of spore former-acid producing bacteria for acetic acid production under high initial acetic acid concentration process

Thirty samples of contaminated saccharified rice were taken for screening of spore former-acid producing bacteria. Among the screened isolates, fifteen that were coded as P1-P15, were spore former bacteria. These fifteen were observed to make a clear zone around their colonies when cultured on sterile *Paenibacillus*-basal agar medium supplemented with CaCO_3 , indicating that they were acid producer strains. Subsequently, they were tested, using the method described by Krusong et al. (2015), for their ability to produce acid at 30 ± 2 °C for 30 days under high initial acetic acid (HAA_i) acetification process with 80 g L^{-1} total concentration of 45 g L^{-1} acetic acid (AA) and 35 g L^{-1} ethanol (ET). The aeration was controlled at 4 L min^{-1} . Results (Fig. 1) showed that the isolate coded as P8 was the highest acid producing among the samples and was therefore used for subsequently studies.

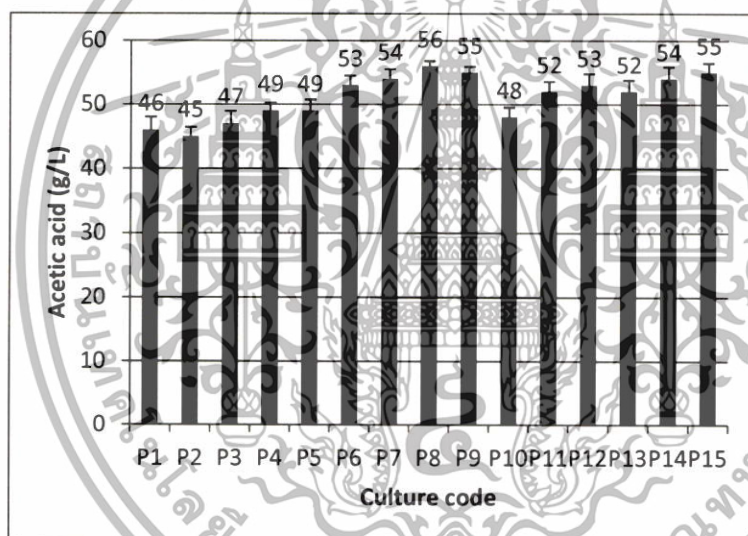


Fig. 1. Acetic acid production by screened spore former-acid producing strains at 30 ± 2 °C during 30 days of cultivation. Each value is the mean of three parallel replicates \pm standard deviation.

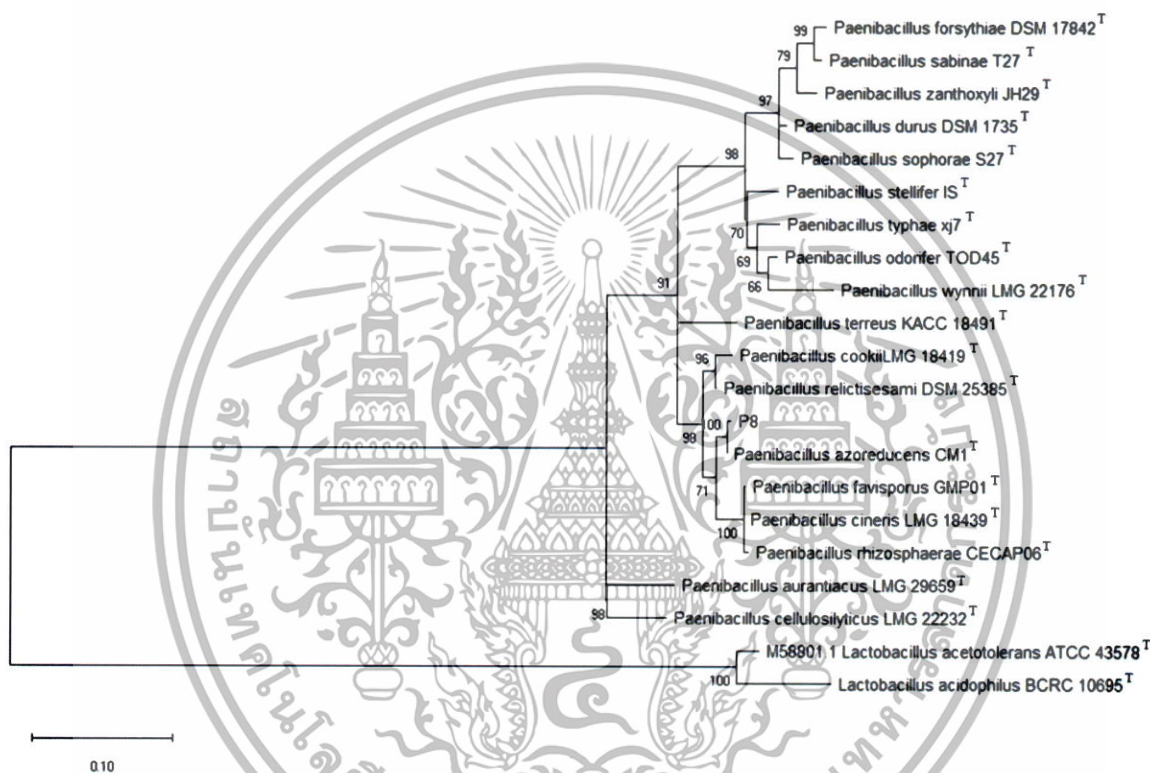
Phylogenetic analysis of P8 strain

In order to identify P8 strain, an almost complete 16S rRNA gene sequence (1515 bp) was determined. From the multiple alignment of all 21 strains, the sequences were trimmed to the same length, reducing the total sequence length to 1354. The ML phylogenetic tree obtained (Fig. 2) showed the presence of three major clades. 16S rRNA sequence of P8 strain had highest similarity (99.855 %) with *Paenibacillus azoreducens* CM1^T. The bootstrap value of 100, highlight the strength of the analysis. The distant matrix (Supplementary material) computed, excluding the outgroup represented by *Lactobacillus* strains, showed that the distant index of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

both P8 and *P. azoreducens* CM1^T was 0.145%, meaning the sequence similarity was 99.855%. The average distant values among overall strains was calculated resulting of 5,444%. Given the high similarity percentage compared with the average distant calculated for all 21 strains, it can be assumed that P8 is a new strain of *P. azoreducens* species.

Fig. 2. Phylogenetic tree of the screened bacteria *Paenibacillus azoreducens* which produce high acetic acid at 30±2 C for 30 days.



Comparison of acetification performance and volatile components produced by Paenibacillus azoreducens and Acetobacter aceti under high initial acetic acid concentration process

Normally, there are two phases of acetification consisting of a start-up phase and an operational phase (fermentation). After inoculation, bacteria need to adapt to the new environment, but their ability to adapt is a specific strain trait (Gullo et al., 2014). The isolate, *P. azoreducens* was shown to require 6 weeks to adapt to the high initial acetic acid (HAA_i) acetification, which is a severe condition for most bacteria (Fig 3a). On the other hand, shortening the period of only 6 days for *A. aceti* was found to be suitable (Fig.3b). For the operational phase, long period of acetification (6 weeks) was found to be necessary for *P. azoreducens*, but only 4 days was for *A. aceti*. However, the results of acid production from both strains at the end of the acetification cycle were similar, with 73 g L⁻¹ for *P. azoreducens* and 79 g L⁻¹ for *A. aceti*. However, after the end of acetification process at 0 g L⁻¹ ethanol, there was no

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

change of AA (73 g L^{-1}) for *P. azoreducens* after 12-14 weeks, but the reduction of AA (77 g L^{-1}) for *A. aceti* after 10-14 days.

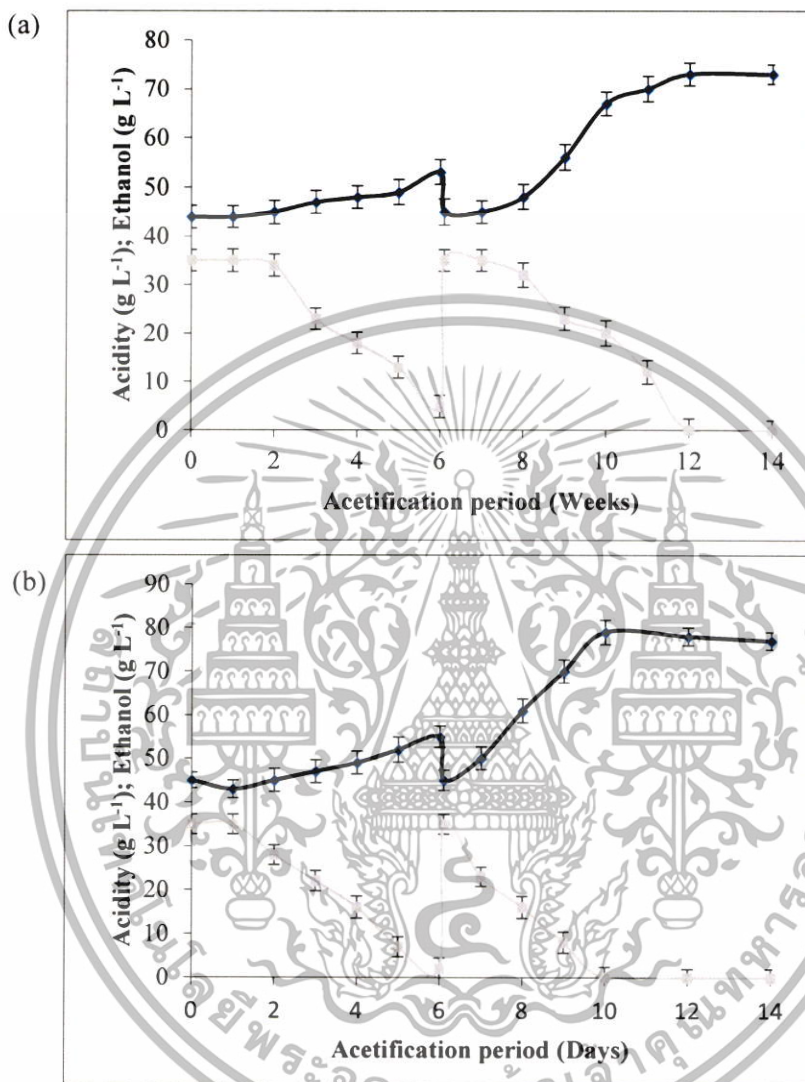


Fig. 3. Acetification under high initial acetic acid concentration: (a) *Paenibacillus azoreducens*; (b) *Acetobacter aceti*. Acetic acid and ethanol concentrations are adjusted constantly at 45 g L^{-1} and 35 g L^{-1} , respectively. Symbols: ♦, acidity; ■, ethanol. Each value is the mean of three parallel replicates ± standard deviation.

In addition to acetic acid (AA) produced by *P. azoreducens* and *A. aceti*, their volatile components were determined by GC-MS. Results revealed that among 40 and 37 volatiles found in vinegar produced by *P. azoreducens* and *A. aceti* respectively, there were 20 components that were produced by both strains (Table 1 and 2). Among them, only 8, ethyl acetate; methane, oxybis-; isoamylalcohol; 2-butanone, 3-hydroxy-; acetic acid; benzaldehyde; propanoic acid, 2-methyl-; and pentanoic acid were main components. In addition, results from GC-MS confirmed

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

that AA was detected as the main components in product of *P. azoreducens*, which showed that *P. azoreducens* could produce AA (Table 1).

Table 1. Volatile components of vinegar produced by *Paenibacillus azoreducens* determined by GC-MS.

Component RT	Compound Name	CAS#	Formula*	Component Area	Match Factor	% of Total
3.4066	Acetaldehyde*	75-07-0	C ₂ H ₄ O	4828477.5	91.3	0.03
5.0955	Ethyl Acetate*	141-78-6	C ₄ H ₈ O ₂	2353245444	94.6	15.69
5.8865	Methane, oxybis-*	115-10-6	C ₂ H ₆ O	1446391003	94.6	9.64
7.5917	Acetic acid, 2-methylpropyl ester*	110-19-0	C ₆ H ₁₂ O ₂	139127423.7	89.3	0.93
8.1925	Butanoic acid, ethyl ester	105-54-4	C ₆ H ₁₂ O ₂	94570465.9	93.8	0.63
9.0075	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	108-64-5	C ₇ H ₁₄ O ₂	24353399.3	81.2	0.16
9.1197	Disulfide, dimethyl*	624-92-0	C ₂ H ₆ S ₂	3128137.3	68.7	0.02
9.6436	Isobutylalcohol*	78-83-1	C ₄ H ₁₀ O	2559288.9	82.6	0.02
10.7144	1-Butanol, 3-methyl-, acetate*	123-92-2	C ₇ H ₁₄ O ₂	34999276.3	93.8	0.23
11.5766	1,3-Dioxolane, 4,5-dimethyl-2-pentadecyl-	56599-61-2	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	793322.3	68.3	0.01
11.9103	Oxazole, 4,5-dimethyl-	20662-83-3	C ₅ H ₇ NO	20468078.4	84.2	0.14
13.3035	Isoamylalcohol*	137-32-6	C ₅ H ₁₂ O	185441662.4	95.6	1.24
15.1769	Pyrazine, methyl-	109-08-0	C ₅ H ₆ N ₂	48512571.6	92.4	0.32
15.5356	2-Butanone, 3-hydroxy-*	513-86-0	C ₄ H ₈ O ₂	168997872.5	93.6	1.13
17.04	Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester*	97-64-3	C ₅ H ₁₀ O ₃	33654169.2	78.5	0.22
18.0772	3-(Acetyloxy)-2-butanone*	4906-24-5	C ₆ H ₁₀ O ₃	20934458.3	90.4	0.14
18.3692	Acetic acid*	64-19-7	C ₂ H ₄ O ₂	5789197422	94.8	7.21
19.8976	2-furan-carboxaldehyde	98-01-1	C ₅ H ₄ O ₂	670371399.3	91.9	4.47
21.2164	Benzaldehyde*	100-52-7	C ₇ H ₆ O	540672023.9	96.8	3.6
21.7543	2-Butanone, 4-(acetyloxy)-*	10150-87-5	C ₆ H ₁₀ O ₃	25995012.6	73.6	0.17
21.8405	Propanoic acid, 2-methyl-*	79-31-2	C ₄ H ₈ O ₂	301178116.4	90.5	2.01
22.9552	Butanoic acid*	107-92-6	C ₄ H ₈ O ₂	67991028.8	93.4	0.45
23.6423	Pentanoic acid*	109-52-4	C ₅ H ₁₀ O ₂	752384100.6	92	5.02
25.1307	Naphthalene*	91-20-3	C ₁₀ H ₈	3087984.8	92.8	0.02
25.3551	(S)-(+)-Isoleucinol	24629-25-2	C ₆ H ₁₅ NO	16888981.6	73	0.11
25.6463	Acetic acid, phenyl-, ethyl ester	101-97-3	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	23761288.8	92.8	0.16
25.8559	Acetophenone, 2,4,5-triethyl-	2715-54-0	C ₁₄ H ₂₀ O	2027351.4	83.2	0.01
26.1146	Acetic acid, 2-phenylethyl ester*	103-45-7	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	61756862.5	97.1	0.41
26.3835	Hexanoic acid*	142-62-1	C ₆ H ₁₂ O ₂	79128285.9	94.6	0.53
26.7035	3-Buten-2-one, 3-methyl-4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-	127-51-5	C ₁₄ H ₂₂ O	1576299.6	83.4	0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

27.0345	Adipic acid, 2,4-dimethylpent-3-yl isobutyl ester	2000532-52-8	C ₁₇ H ₃₂ O ₄	3406092.8	68	0.02
27.436	<i>Benzeneethanol*</i>	60-12-8	C ₈ H ₁₀ O	348606610.5	97.3	2.32
28.6518	Phenol	108-95-2	C ₆ H ₆ O	1694766.4	76	0.01
28.7834	Pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4-di-t-butylphenyl esters	166273-38-7	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	892790.9	67	0.01
29.2712	Octanoic acid	124-07-2	C ₈ H ₁₆ O ₂	39195729.5	93.5	0.26
29.4892	Caryophyllenyl alcohol	913176-41-7	C ₁₅ H ₂₆ O	2530766.1	64	0.02
31.8485	Decanoic acid	334-48-5	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1056726.4	72.3	0.01
32.2686	5,6,7,8-Tetrahydro-8,8-dimethyl-2-indolizinecarboxylic acid methyl ester	2000224-92-1	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	1650383131	82.1	11
33.8314	Benzoic acid	65-85-0	C ₇ H ₆ O ₂	7451135.9	71.1	0.05
36.1808	3-amino-4,5,6-trimethyl-thieno[2,3-B]pyridine-2-carboxylic acid tert-butylamide	2000501-84-7	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ OS	16468136.4	60.6	0.11

* Compound names and formulas which were shown in italic form were found in both GC-MS chromatogram of *P. azoreducens* and *A. aceti*.

Table 2. Volatile components of vinegar produced by *Acetobacter aceti* determined by GC-MS.

Component RT	Compound Name	CAS#	Formula*	Component Area	Match Factor	% of Total
3.4061	<i>Acetaldehyde*</i>	75-07-0	C ₂ H ₄ O	6999246.9	83.4	0.06
5.0465	<i>Ethyl Acetate*</i>	141-78-6	C ₄ H ₈ O ₂	1308584233	94.6	10.91
5.8372	<i>Methane, oxybis-*</i>	115-10-6	C ₂ H ₆ O	347279202.7	89.8	2.89
6.803	2,3-Butanedione	431-03-8	C ₄ H ₆ O ₂	271480011.7	92.5	2.26
7.5834	Isobutyl acetate	110-19-0	C ₆ H ₁₂ O ₂	122616008.8	93.5	1.02
9.1324	<i>Disulfide, dimethyl*</i>	624-92-0	C ₃ H ₆ S ₂	11247301.7	64.3	0.09
9.6442	<i>Isobutylalcohol*</i>	78-83-1	C ₄ H ₁₀ O	8118441.1	91.6	0.07
10.5573	3-methylbutyl 2-oxopropanoate	7779-72-8	C ₈ H ₁₄ O ₃	25893946.9	92.2	0.22
10.8224	<i>1-Butanol, 3-methyl-, acetate*</i>	123-92-2	C ₇ H ₁₄ O ₂	98998845.5	96.5	0.83
13.4474	<i>Isoamylalcohol*</i>	123-51-3	C ₅ H ₁₂ O	348946523.7	95.5	2.91
14.2065	Acetic acid, anhydride	108-24-7	C ₄ H ₆ O ₃	10738673.1	83.5	0.09
15.6043	<i>2-Butanone, 3-hydroxy-*</i>	513-86-0	C ₄ H ₈ O ₂	286712291	93.1	2.39
17.0678	<i>Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester*</i>	97-64-3	C ₅ H ₁₀ O ₃	82300126.9	96.9	0.69
17.5423	1,3-Dioxan-5-ol, 4,4,5-trimethyl-	54063-14-8	C ₇ H ₁₄ O ₃	4713875.2	62.9	0.04
18.0929	<i>3-(Acetyloxy)-2-butanone*</i>	4906-24-5	C ₆ H ₁₀ O ₃	13094275.1	91.9	0.11
18.2338	<i>Acetic acid*</i>	64-19-7	C ₂ H ₄ O ₂	7142863733	95.1	7.89
21.2608	<i>Benzaldehyde*</i>	100-52-7	C ₇ H ₆ O	463180655.9	84.5	3.86
21.7532	<i>2-Butanone, 4-(acetyloxy)-*</i>	10150-87-5	C ₆ H ₁₀ O ₃	12569367.4	71.7	0.49
21.8385	<i>Propanoic acid, 2-methyl-*</i>	79-31-2	C ₄ H ₈ O ₂	253806031.2	91.8	2.12
22.1427	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	620-02-0	C ₆ H ₆ O ₂	55092770.7	91.7	0.46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

22.3792	1 - cyclopentene - 3,4 - di - one	2000008-43-4	C ₅ H ₄ O ₂	35233139.8	83.7	0.29
22.9643	<i>Butanoic acid*</i>	107-92-6	<i>C₄H₈O₂</i>	25357116.2	88.6	0.21
23.235	2(3H)-Furanone, dihydro-	96-48-0	C ₄ H ₆ O ₂	7850092.2	62.3	0.07
23.4808	Benzeneacetaldehyde	122-78-1	C ₈ H ₈ O	8709543.5	85.4	0.07
23.6736	<i>Pentanoic acid*</i>	109-52-4	<i>C₅H₁₀O₂</i>	216205300.7	89.9	1.8
24.2235	L-.alpha.-Terpineol	10482-56-1	C ₁₀ H ₁₈ O	3331502.1	69.9	0.03
24.4952	1-Propanol, 3-(methylthio)-	505-10-2	C ₄ H ₁₀ OS	8659909.4	81.1	0.07
24.7854	Acetic acid, phenylmethyl ester	140-11-4	C ₉ H ₁₀ O ₂	3705089	71.1	0.03
25.1377	<i>Naphthalene*</i>	91-20-3	<i>C₁₀H₈</i>	8544835.9	94.8	0.07
25.3566	2-Butenoic acid	3724-65-0	C ₄ H ₆ O ₂	5065418.9	74.4	0.04
26.1187	<i>Acetic acid, 2-phenylethyl ester*</i>	103-45-7	<i>C₁₀H₁₂O₂</i>	98203150.3	98.3	0.82
26.3913	<i>Hexanoic acid*</i>	142-62-1	<i>C₆H₁₂O₂</i>	9829193	90.9	0.08
26.9161	Benzyl alcohol	100-51-6	C ₇ H ₈ O	7094432.2	94.3	0.06
27.44	<i>Benzeneethanol*</i>	60-12-8	<i>C₈H₁₀O</i>	632879130.3	97.7	5.27
30.6742	4,4-Dimethyl-3-(3-methylbut-2-enylidene)octane-2,7-dione	98419-10-4	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	1016732.5	65.5	0.01
33.8524	.beta.-1,5-O-Dibenzoyl-ribofuranose	2000696-25-7	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	3794906.6	67.1	0.03
34.651	5-Hydroxymethylfurfural	67-47-0	C ₆ H ₆ O ₃	1561246.1	67.5	0.01

* Compound names and formulas which were shown in italic form were found in both GC-MS chromatogram of *P.* and *A. aceti*.

Semi-continuous acetification by Paenibacillus azoreducens

According to the findings of Ndoye et al. (2007) and Krusong et al. (2015) AA production was normally considered complete when the remaining ethanol in the medium was 5 g L⁻¹ or below. Therefore, the subsequent AA production cycle of the semi-continuous process was started with the discharged of 40% of the total volume (80 L in 100 L internal Venturi injector bioreactor). The 40% of total volume of the fresh medium was placed in the bioreactor and then the new AA production cycle was started. Nine cycles of AA production by *P. azoreducens* were conducted. In addition to the start-up phase, 69±0.5 to 79±0.2 g L⁻¹ AA was produced during nine consecutive acetification cycles with the average acetification rate at 5.7 g L⁻¹week⁻¹ and a bio-transformation yield at 90.1% (Table 3). Longer periods of each acetification cycle were observed, which need further investigation in order to improve the activity of *P. azoreducens*.

Table 3. Semi-continuous acetification under high initial acetic acid concentration (HAA_i) by *Paenibacillus azoreducens*: 45±1 g L⁻¹ acetic acid with constant 35±1 g L⁻¹ ethanol concentration at 30±1 °C (total concentration 80 g L⁻¹).

Experiment Time (Week)	Total acidity* Initial	Total acidity* Final	Acid produced* (g L ⁻¹ W ⁻¹)	ETA (g L ⁻¹ W ⁻¹)	Ethanol* Initial	Ethanol* Final	Ethanol oxidized* (g L ⁻¹)	Bio- transformation (g L ⁻¹)	CDW (g L ⁻¹)
------------------------	------------------------	----------------------	---	--	------------------	----------------	--	--	--------------------------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)		(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	Yield (%)	
Start up	6	44±0.2	53±0.1	9±0.1	1.5	35±0.1	4.9±0.1	30.1±0.1	29.9	0.026
Cycle 1	6	45±0.3	73±0.3	28±0.3	4.7	35±0.3	3±0.2	32±0.2	87.5	0.029
Cycle 2	5	45±0.2	75±0.2	30±0.2	6	35±0.4	1±0.1	34±0.2	88.2	0.043
Cycle 3	5	45±0.3	78±0.2	33±0.2	6.6	35±0.1	1±0.1	34±0.1	97.1	0.045
Cycle 4	5	45±0.2	76±0.3	31±0.2	6.2	35±0.3	2±0.3	33±0.3	93.9	0.04
Cycle 5	5	45±0.5	78±0.4	33±0.4	6.6	35±0.3	1±0.2	34±0.2	97.1	0.048
Cycle 6	6	45±0.2	69±0.5	24±0.3	4	35±0.1	3±0.1	32±0.1	75	0.027
Cycle 7	6	45±0.4	70±0.2	25±0.3	4.2	35±0.1	3±0.1	32±0.1	78.1	0.031
Cycle 8	5	45±0.5	79±0.2	34±0.3	6.8	35±0.3	0	35±0.3	97.1	0.042
Cycle 9	5	45±0.3	78±0.5	33±0.4	6.6	35±0.2	1±0.1	34±0.1	97.1	0.048
Average**					5.7				90.1	

* Values represent the mean ± standard deviation of triplicate. ** Average ETA and biotransformation yield were calculated among nine semi-continuous cycles, not including start-up phase. Abbreviation: ETA, acetification rate; CMC, cell dry weight.

Discussion

Screening and selection of spore former-acid producing bacteria for acetic acid production under high initial acetic acid concentration process

Fifteen spore former-acid producing isolates coded as P1-P15 were obtained from screening and tested subsequently for acetic acid (AA) production under high initial acetic acid concentration (HAA_i) process. As reported by [Krusong and Tantratian \(2014\)](#) and [Krusong et al. \(2014\)](#), the 45 g L⁻¹ AA from this process is initially adjusted to the medium before starter inoculation. The aim of the use of HAA_i in the process is for the sanitizing effect of AA on microorganisms different from AAB. This process has beneficial effects including reducing the operation costs in the preparation of the medium used for acetification. However, it is known that some AAB, *Acetobacter* spp., which are normally used for commercial vinegar production, gradually develop increased resistance to high AA, when properly adapted to commercial acidification conditions ([Azuma et al., 2009](#); [Gullo et al., 2016](#)). Many reports suggest that for AA content above 20 g L⁻¹ results in bacterial inhibition, with significant slowing of their growth at levels above 40 g L⁻¹. Strong inhibition (70%) occurred when the AA content was 60 g L⁻¹ ([Soo Park et al., 1989](#); [Lasko et al., 2001](#); [de Ory et al., 2002](#)). Severe resistance to high AA content is also important for ethanol oxidation activity ([Torija et al., 2010](#)). This is the reason for the selection of our screened spore-former-acid producing bacteria with high AA tolerance for use in production of AA via the HAA_i process. Results in [Fig. 1](#) showed that the isolate coded as P8 produced high levels of AA. P8 was identified by nucleotide sequence and confirmed as *Paenibacillus azoreducens* (see the phylogenetic tree in [Fig. 2](#)) and used for further investigation.

*Comparison of acetification performance and volatile components produced between *Paenibacillus azoreducens* and *Acetobacter aceti* under high initial acetic acid concentration process*

To investigate the AA production activity of isolate *P. azoreducens* (see [Fig. 3a](#)), the start-up and operational phases of AA production were determined and compared with the activity of our

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

high acid producing strain of *A. aceti* (see Fig. 3b), which showed the similarity of the acetification profile by both strains. However, *P. azoreducens* took longer in both start-up and operational phases than *A. aceti*. This may be due to the low activity of membrane-bound enzymes consisting of aldehyde dehydrogenase (ALDH) and alcohol dehydrogenase (ADH) which catalyze the reaction in changing ethanol to acetic acid. Further study in determination of both enzymes in *P. azoreducens* was our aim. Our result supported the study of Marwoto et al. (2004) who report that strain of *Paenibacillus* spp., especially *P. polymyxa* ATCC 12321 can produce AA. However, it is emphasized that *P. azoreducens* is a novel strain, which primarily produced AA under severe condition as exists in the HAA_i process. Improvement of the acetification activity in our 100 L internal Venturi injector bioreactor was further investigated.

Acetification performance of *P. azoreducens* at 80 g L⁻¹ total solute concentration (TC), required 6 weeks (Fig. 3a) while *A. aceti* required only 6 days (Fig. 3b) for the start-up phase. Normally, the length of this phase is dependent on several factors including the initial concentrations of substrate (AA and ethanol), product (AA) and the behavior of the culture. During this period, the number of cells decreases dramatically with the addition of fresh medium because of the dilution effect (Maestre et al., 2008). Nevertheless, a gradual adaptation of AAB (*A. aceti*) occurs during this period. The operational phase of acetification was thus shortened (Fig. 3b), but there was a big difference in *P. azoreducens*. This result implies a considerable further study for adaptation of the *P. azoreducens* in the bioreactor under HAA_i conditions of good aeration by using the benchmark with *A. aceti*. Moreover, after the end of acetification cycle (with 0 g L⁻¹ ethanol) there was no reduction of AA for *P. azoreducens* when the acetification period was extended under the air supply (Fig. 3b). On the other hand, the reduction of AA was found for *A. aceti* (Fig. 3a). It implied that there was no over-oxidation occurrence for *P. azoreducens*. This is the beneficial approach of the *Paenibacillus* for commercial acetification.

From the GC-MS analysis (Table 1), AA was detected in the product of isolate *P. azoreducens*, which confirmed that *P. azoreducens* had the ability to produce AA under the HAA_i process. Organic volatile components (OVCs) in products of *P. azoreducens* and *A. aceti* (shown in Table 1 and 2, respectively) were determined, which showed that besides AA, *P. azoreducens* produced 19 OVCs which were similar to those produced by *A. aceti*. Among these similar OVCs, eight were the main components. All these similar OVCs may have an effect on the sensorial tests of flavor and aroma of vinegar produced by both *P. azoreducens* and *A. aceti*.

Semi-continuous acetification by Paenibacillus azoreducens

Acetification performance during the start-up phase and the 9 cycles of operational phase was conducted using the HAA_i process at 80 g L⁻¹ TC (Table 3). Lengthening of the adaptation during start-up phase and an increase in the operational phase were observed. This result emphasizes the importance of using well-screened *P. azoreducens* against the toxic effects of high concentration of AA. We confirm that *P. azoreducens* exhibited high AA-tolerance and resulted in good survival and high production of AA from initial concentrations of 45 g L⁻¹. Moreover, it was still at low acetification rate (ETA) when compared with that produced by AAB such as 2.2±0.06 gL⁻¹d⁻¹ by industrial culture of vinegar in Spain in a 100 L fermenter (Fregapane et al., 2001); 12 gL⁻¹d⁻¹ by *A. senegalensis* sp. nov. (CWBI-B418^T) in a 100 L acetifier (Ndoye et al., 2007); 5 gL⁻¹h⁻¹ *A. pasteurianus* in a 150 L acetator (Mounir et al., 2018) and our previous study on *A. aceti* with ETA (8.14±0.09 gL⁻¹d⁻¹) (Krusong et al., 2014).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

In this semi-continuous process, using the HAA_i process, a gradual increment in ETA occurred during the series of acetification cycles. This was due to the high oxidative activity of our well-screened *P. azoreducens*. However, a decrease in ETA was also observed in some cycles (cycle No. 6-7) due to the oscillation of cell viability as normally occurred in AAB (Maestre et al., 2008). The adapted *P. azoreducens* cells grew in an exponential manner during the operational phase and then went through a period of the oscillation with alternating periods of growth and autolysis. This behavior is similar to that found in *A. aceti* (Krusong et al., 2014, 2015).

Results of biotransformation yield (Table 3) show that a higher yield was found under the HAA_i process. Normally, the AAB used in industrial acetification processes is an ethanol-tolerant strain (Yuan et al., 2013). This implies that our well-screened *P. azoreducens* might be a high acid-tolerant strain containing high oxidative activity and is similar to the ethanol-tolerant industrial AAB strains reported by others (Qi et al., 2013).

The relationships between ETA and CDW over nine cycles of semi-continuous acetification using the HAA_i process (Table 3) show that during the 2nd cycle there was a rapid increment in CDW which resulted in high ETA, which indicates the adaptation of *P. azoreducens* cells under conditions of high AA concentration. This further suggests that it may be possible, in the future, to adapt or improve this culture to increase the speed of the ETA in new environments with high initial AA concentrations. Moreover, over the first five cycles, the ETA was slightly higher due to the slightly higher CDW. In these cases, the oscillation of CDW resulted in decreased ETA in the 6th to 7th cycles. This was not directly related to the decrease in viability of cells observed at high final acidities but were probably related to the toxic impact of AA on cells as mentioned in a number of reports of acetic acid bacteria (Saeki et al., 1997; Lu et al., 1999; Baena-Ruano et al., 2010).

There were interesting late results following the adverse increase in CDW between the 8th and 9th cycles with a gradual increase in ETA. This was the key factor influencing several semi-continuous acetification operations and resulting in increased acid tolerance of cells as suggested by Arnold et al. (2002) and others. Our results show that *P. azoreducens* can produce AA and that there was clear oscillation in CDW during the 6th to 7th cycles.

Conclusion

After screening spore-former acid producing bacteria that can be adapted to resist the severe surroundings during the fermentation process, especially high initial acetic acid concentration, a novel strain of *P. azoreducens* was obtained. Using this novel strain there was high levels of acetic acid production during the semi-continuous acetification process under these severe conditions, which was confirmed by GC-MS analysis. The main advantage of this study is the possibility to produce higher acetic acid concentrations in the finished fermented product. This is the first report that a strain of *Paenibacillus* is able to produce high acetic acid content in the severe high initial acetic acid concentration conditions under semi-continuous processing. In addition, there were two beneficial results of *P. azoreducens* including no bacterial cellulose formed during running acetification process and no over-oxidation after complete acetification

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

which normally formed by acetic acid bacteria, *A. aceti*. Therefore, this strain provides an alternative to *A. aceti* for the acetification process which may directly impact the fermentation industry making the fermentation process more efficient. Therefore, the investigation of the improvement on acetification rate by *P. azoreducens* is interesting and will be further investigated.

Conflict of Interest

We have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge funding of this research (2562-01-07001) by Faculty of Agro-Industry Research Fund, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabangs, Thailand.

References

- Arnold, S., Becker, T., Delgado, A., Emde, F., and Enenkel, A. (2002). Optimizing high strength acetic acid bioprocess by cognitive methods in an unsteady state cultivation. *Journal of Biotechnology*. 97, 133-145.
- Ash, C., Priest, F.G., Collins, M.D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test: proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Leeuwenhoek*. 64, 253-260.
- Azuma, Y., Hosoyama, A., Matsutani, M., Furuya, N., Horikawa, H., Harada, T., Hirakawa, H., Kuhara, S., Matsushita, K., Fujita, N., and Shirai, M. (2009). Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Research*. 37, 5768-5783.
- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Bonilla-Venceslada, J.L., Álvarez-Caliz, C. and García-García, I. (2010). Influence of the final ethanol concentration on the acetification and production rate in the wine vinegar process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 85, 908-912.
- Chung, Y.R., Kim, C.H., Hwang, I., and Chun, J. (2000). *Paenibacillus koreensis* sp.nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50, 1495-1500.
- de Ory, I., Romeo, L.E., and Cantero, D. (2002). Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*. 52, 31-37.
- de Ory, I., Romero, L.E., and Cantero, D. (2004). Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*. 63, 39-45.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32, 1792-1797.
- Ewing, B., and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*. 8, 186-94.
- Fregapane, G., Rubio-Fernández, H. and Salvador, M.D. (2001). Influence of fermentation temperature on semi-continuous acetification for wine vinegar production. *European Food Research and Technology*. 213, 62-66.
- Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., and Yuan, Z.C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*. 15, 203. DOI 10.1186/s12934-016-0603-7
- Gullo, M., Verzelloni, E., and Canonico, M. (2014). Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. *Process Biochemistry*. 49, 1571-1579.
- Gullo, M., Zanichelli, G., Verzelloni, E., Lemmetti, F., and Giudici, P. 2016. Feasible acetic acid fermentations of alcoholic and sugary substrates in combined operation mode. *Process Biochemistry*. 51, 1129-1139.
- Holl, F.B., and Chanway, C.P. (1992) Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Canadian Journal of Microbiology*. 38, 303-308.
- Kim, J.M., Lee, S.H., Lee, S.H., Choi, E.J., and Jeon, C.O. (2013) *Paenibacillus hordei* sp. nov., isolated from naked barley in Korea. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 103, 3-9.
- Krusong, W., Vichitraka, A., and Pornpakdeewattana, S. (2007). Luffa sponge as supporting material of *Acetobacter aceti* WK for corn vinegar production in semi-continuous process. *KMITL Science Journal*. 7, 63-68.
- Krusong, W., and Tantratian, S. (2014) Acetification of rice wine by *Acetobacter aceti* using loofa sponge in a low-cost reciprocating shaker. *Journal of Applied Microbiology*. 117, 1348-1357.
- Krusong, W., Pornpakdeewattana, S., Kerdpiboon, S., and Tantratian, S. (2014). Prediction of influence of stepwise increment of initial acetic acid concentration in charging medium on acetification rate of semi-continuous process by artificial neural network. *LWT - Food Science and Technology*. 56, 383-389.
- Krusong, W., Yaiyen, S., and Pornpakdeewattana, S. 2015. Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*. 118, 629-640.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35, 1547-1549.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lasko, D.R., Zamboni, N., and Sauer, U. (2001). Bacterial response to acetate challenge: a comparison of tolerance among species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54, 243-247.
- Liu, Y., Zhao, R., Wang, R., Yao, S., Zhai, L., Zhang, X., Chen, C., Cao, Y., Xu, T., Ge, Y., Zhao, J., and Cheng, C. (2016). *Paenibacillus chinensis* sp. nov., isolated from maize (*Zea mays* L.) seeds. *Antonie van Leeuwenhoek*. 109, 207-213.
- Lu, S.F., Lee, F.L., and Chen, H.K. (1999) A thermotolerant and high acetic acid-producing bacterium *Acetobacter* sp.I14-2. *Journal of Applied Microbiology*. 86, 55-62.
- Maestre, O., Santos-Dueñas, I.M., Peinado, R., Jiménez-Ot, C., García-García, I., and Mauricio, J.C. (2008) Changes in amino acid composition during wine vinegar production in a fully automatic pilot acetator. *Process Biochemistry*. 43, 803-807.
- Marwoto, B., Nakashimada, Y., Kakizono, T., and Nishio, N. (2004). Metabolic analysis of acetate accumulation during xylose consumption by *Paenibacillus polymyxa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64, 112-119.
- Mounir, M., Fauconnier, M.L., Afechtal, M., Thonart, P., Alaoui, M.I., and Delvigne, F. (2018). Aroma profile of pilot plant-scale produced fruit vinegar using a thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strain isolated from Moroccan cactus. *Acetic Acid Bacteria*. 7, 7312.
- Nakashimada, Y., Kanai, K., and Nishio, N. (1998). Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2,3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. *Biotechnology Letter*. 20, 1133-1138.
- Ndoye, B., Lebecque, S., Destain, J., Guiro, A.T., and Thonart, P. (2007). A new pilot scale acetifier designed for vinegar production in Sub-Saharan Africa. *Process Biochemistry*. 42, 1561-1565. DOI: [10.1016/j.procbio.2007.08.002](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.08.002)
- Priest, F.G. (1977) Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*. 41, 711-753.
- Qi, Z., Yang, H., Xia, X., Xin, Y., Zhang, L., Wang, W., and Yu, X. (2013) A protocol for optimization vinegar fermentation according to the ratio of oxygen consumption versus acid yield. *Journal of Food Engineering*. 116, 304-309.
- Raza, W., Makeen, K., Wang, Y., Xu, Y., and Qirong, S. (2011). Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. *Bioresource Technology*. 102, 6095-6103.
- Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N., and Adachi, O. (1997) Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 61, 138-145.
- Slepecky, R., and Hemphill, E. (1992). The genus *Bacillus*-nonmedical. In: Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H. (eds) *The prokaryotes*. Springer-Verlag, New York, pp 1663-1696.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Soo Park, Y., Ohtake, H., Fukaya, M., Kawamura, Y., and Toda, K. (1989). Effects of dissolved oxygen and acetic acid concentrations on acetic acid production in continuous culture of *Acetobacter aceti*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 68, 96-101.
- Tamura, K., and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10, 512-526.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101, 11030-11035.
- Tang, Q.Y., Yang, N., Wang, J., Xie, Y.Q., Ren, B., Zhou, Y.G., Gu, M.Y., Mao, J., Li, W.J., Shi, Y.H., and Zhang, L.X. (2011). *Paenibacillus algorifonticola* sp.nov., isolated from a cold spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61, 2167-2172.
- Torija, J.M., Mateo, E., Guillamón, J.M., and Mas, A. (2010) Design and optimization of TaqMan-MGB probes for the identification and quantification of acetic acid bacteria. *Food Microbiology*. 27, 257-265.
- Vas, G., and Vékey, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*. 39, 233-254.
- von der Weid, I.A., Paiva, E., Norega, A., van Elsas, J.D., and Seldin, L. (2000) Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. *Research in Microbiology*. 151, 369-381.
- Weon-Taek, S., Kahng, G.G., Nam, S.H., Choi, S.D., Suh, H.H., Kim, S.W., and Park, Y.H. (1999). Isolation and characterization of a novel exopolysaccharide-producing *Paenibacillus* sp. WN9 KCTC 8951P. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9, 820-825.
- Yao, R., Wang, R., Wang, D., Su, J., Zheng, S.X., and Wang, G.J. (2014). *Paenibacillus selenitireducens* sp.nov., a selenite-reducing bacterium isolated from a selenium mineral soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64, 805-811.
- Yuan, Y., Feng, F., Chen, L., Yao, Q., and Chen, K. (2013). Directional isolation of ethanol-tolerant acetic acid bacteria from industrial fermented vinegar. *European Food Research and Technology*. 236, 573-578.
- Zeigler, D.R. (2013). The family *Paenibacillaceae*. In: *Strain catalog and reference*. Columbus: Bacillus Genetic Stock Center. p. 1-32.

Supplementary material: Estimates of evolutionary divergence between sequences

The number of base substitutions per site from between sequences are shown. Analyses were conducted using the Maximum Composite Likelihood model (Tamura *et al.*, 2004). The rate variation among sites was modeled with a gamma distribution (shape parameter = 1). This

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

analysis involved 19 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd +Noncoding. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1354 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Kumar et al., 2018).

P8	P8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	0.07539																		
2	0.00299	0.07259																	
3	0.07598	0.05565	0.07319																
4	0.02392	0.06379	0.02072	0.06700															
5	0.02708	0.06996	0.02386	0.07779	0.03684														
6	0.06826	0.08373	0.06551	0.08350	0.06205	0.05240													
7	0.02550	0.06461	0.02309	0.06692	0.00150	0.03845	0.06197												
8	0.06612	0.08731	0.06617	0.08403	0.06280	0.06890	0.02479	0.06450											
9	0.06166	0.08049	0.05999	0.08962	0.05131	0.04607	0.02208	0.05297	0.04438										
10	0.02148	0.06989	0.02067	0.06935	0.03025	0.01138	0.05675	0.03021	0.05332	0.05134									
11	0.02791	0.06642	0.02468	0.07054	0.00225	0.04094	0.05641	0.00526	0.05142	0.05469	0.03427								
12	0.06075	0.08832	0.06080	0.08232	0.05936	0.06718	0.02643	0.06197	0.01212	0.04363	0.05919	0.06199							
13	0.06786	0.09013	0.06597	0.09154	0.06445	0.05726	0.01370	0.06529	0.02856	0.03442	0.06046	0.06885	0.02702						
14	0.06494	0.08077	0.06503	0.09051	0.05746	0.04961	0.01448	0.06205	0.04097	0.02788	0.03818	0.06091	0.01677	0.03679					
15	0.04601	0.07985	0.04428	0.07148	0.04859	0.05706	0.05592	0.05199	0.04894	0.03944	0.04674	0.05244	0.05223	0.06243	0.05904				
16	0.06678	0.08030	0.06518	0.09305	0.05381	0.04255	0.03200	0.05634	0.04864	0.02459	0.05627	0.05720	0.04202	0.03115	0.03269	0.06358			
17	0.06529	0.09586	0.06893	0.09710	0.06452	0.06016	0.03406	0.06538	0.06281	0.03697	0.06015	0.06890	0.06272	0.05906	0.04955	0.07013	0.04368		
18	0.06344	0.09567	0.06549	0.08494	0.06272	0.06816	0.02083	0.06444	0.02346	0.04271	0.05140	0.06710	0.02306	0.02543	0.04174	0.04868	0.04611	0.05835	

P8 = Isolate; spore former-acid producing bacteria

- 1 = *Paenibacillus aurantiacus* LMG 29659
- 2 = *Paenibacillus azoreducens* CM1
- 3 = *Paenibacillus cellulosilyticus* LMG 22232
- 4 = *Paenibacillus cineris* LMG 18439
- 5 = *Paenibacillus cookii* LMG 18419
- 6 = *Paenibacillus durans* DSM 1735
- 7 = *Paenibacillus favisporus* GMP 01
- 8 = *Paenibacillus forsythiae* DSM 17842
- 9 = *Paenibacillus odorifer* TOD 45
- 10 = *Paenibacillus relictisesami* DSM 25385
- 11 = *Paenibacillus rhizosphaerae* CECAP 06
- 12 = *Paenibacillus sabinae* T27
- 13 = *Paenibacillus sopharae* S27
- 14 = *Paenibacillus stellifer* IS
- 15 = *Paenibacillus terreus* KACC 18491
- 16 = *Paenibacillus typhae* xj7
- 17 = *Paenibacillus wynnii* LMG 22176
- 18 = *Paenibacillus zanthoxyli* JH 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้