Thesis Title	Biodiversity and Production of L-Sorbose by Acid-Tolerant Acetic Acid Bacteria
Author	Mrs. Watcharee Hanmoungjai
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong — Chairperson
	Dr. Piyanuch Boonkumklao — Member
	Prof. Dr. Yuzo Yamada — Member
	Prof. Dr. Ken Izumori — Member

ABSTRACT

In this study, 124 strains of acid-tolerant acetic acid bacteria (AAB) were isolated from fruits and flowers collected in Chiang Mai, Thailand, by various kinds of enrichment cultures approach for acetic acid bacteria at pH 3.5. All the isolates were Gram-negative rods, which grew only aerobically and were capable of producing acid when cultured in the glucose-ethanol-$CaCO_3$ agar medium. Based on their morphological, physiological and biochemical characteristics, these AAB were initially classified in the Genera of *Acetobacter* (17 strains), *Acidomonas* (16 strains), *Asaia* (39 strains), *Gluconacetobacter* (21 strains), and *Gluconobacter* (31 strains). Further study was then performed to investigate whether the AAB isolates had the potential for L-sorbose production. For this, the cystein-carbazole reaction was introduced to preliminary screen the presence of ketoses in bacterial-culture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

supernatants. It was showen that 58 isolates were positive by the development of purplish colour at A_{580}. However, only five strains (CMU 48-1, CMU 48-2, CMU R1-1, CMU R4-1 and CMU Ma-2) were subject to detailed analyses of their potential for L-sorbose production as indicated by high amount of L-sorbose obtained (between 47-65 µg). Determination of L-sorbose production by Thin Layer Chromatography (TLC) with solvent phenol-water (4:1 (v/v)) was investigated. It was found that all five isolates were determined R_f as 0.37 by compared with L-sorbose standard. Results obtained from High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis confirmed the bioproduction of L-sorbose from these five strains. In addition, it should be interesting to note that they were also able to produce L-psicose from allitol. The same oxidation pathway might be working on the both polyol oxidation of D-sorbitol to L-sorbose and allitol to L-psicose. The two of the four entrances to L-world from D-world (Izumoring). These five strains were identified as *Gluconacetobacter* sp based on biochemical assays. Of these, *Gluconacetobacter* strain CMU 48-1 isolated from pineapple (*Ananus comosus*). The yield of L-sorbose from D-sorbitol was 47.5% and 67.5% and allitol to L-psicose was 27.7% when using 1% and 3% D-sorbitol and 1% allitol as substrates repectively. To reveal their species identity, the 16S rRNA gene sequenced were amplified from genomic DNA of the selected four strains, sequenced, and aligned with those of other AAB species available in the GenBank database. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences revealed that *Gluconacetobacter* strains CMU 48-1, CMU 48-2, CMU R1-1 and CMU Ma-2 were closely related to *Gluconacetobacter liquefaciens*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายทางชีวภาพและการผลิต แอล-ซอร์โบส โดยอะซิติกแอซิดแบคทีเรียที่ทนกรด

ผู้เขียน นางวัชรี หาญเมืองใจ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. สายสมร ลำยอง	ประธานกรรมการ
อ. ดร. ปิยะนุช บุญคุ้มเกล้า	กรรมการ
Prof. Dr. Yuzo Yamada	กรรมการ
Prof. Dr. Ken Izumori	กรรมการ

บทคัดย่อ

แยกเชื้ออะซิติกแอซิดที่ทนกรดจากดอกไม้และผลไม้ ในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 124 สายพันธุ์ โดยใช้อาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด ที่ pH 3.5 พบว่าทุกสายพันธุ์มีรูปร่างท่อนแกรมลบ สามารถเจริญได้ดีที่สภาวะมีออกซิเจน และสามารถผลิตกรด เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งกลูโคส-เอทานอล-แคลเซียมคาร์บอเนต จากการจำแนกเชื้ออะซิติกแอซิดที่ทนกรดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี สามารถจัดจำแนกในระดับจีนัส และบอกถึงความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้ออะซิติกแอซิดได้ดังนี้ คือเป็น *Acetobacter* sp. 17 สายพันธุ์ *Acidomonas* sp. 16 สายพันธุ์ *Asaia* sp. 39 สายพันธุ์ *Gluconacetobacter* sp. 21 สายพันธุ์ *Gluconobacter* sp. 31 สายพันธุ์ เชื้ออะซิติกแอซิดที่ทนกรดที่แยกได้ทั้งหมด เมื่อนำมาตรวจกรองความสามารถในการผลิตแอล-ซอร์โบส และจากการคัดเลือกการผลิตแอล-ซอร์โบส โดยการวัดปริมาณน้ำตาลดีโตสจากน้ำเลี้ยงของเชื้ออะซิติกแอซิด โดยใช้วิธี cystein-carbazole reaction พบว่ามีเพียง 58 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตน้ำตาลดีโตสได้ จากผลการทดลองจะปรากฏสีเป็นสีม่วง ที่ A_{580} จากการทดลองมีเพียง 5 สายพันธุ์ (CMU 48-1, CMU 48-2, CMU R1-1, CMU R4-1 และ CMU Ma-2) ที่ให้ค่าการผลิต แอล-ซอร์โบสสูง (ระหว่าง 47-65 ไมโครกรัม) เมื่อนำทั้ง 5 สายพันธุ์ไปทดสอบการผลิตแอล-ซอร์โบส โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) เมื่อใช้ phenol - water (4 : 1 (v/v)) เป็นตัวทำละลาย พบว่าทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถผลิตแอล-ซอร์โบส โดยให้ค่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

R_f เท่ากับ 0.37 เมื่อเทียบกับแอล-ซอร์โบสมาตรฐาน จากผลการวิเคราะห์โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อยืนยันในการผลิตแอล-ซอร์โบส ของทั้ง 5 สายพันธุ์ นอกจากนั้นทั้ง 5 สายพันธุ์ ยังสามารถผลิต แอล-ไซโคสจากอะลิทอลได้อีกด้วย ซึ่งเป็นไปตามขบวนการออกซิเดชั่นของพอลิออลออกซิเดชั่นของทั้ง ดี-ซอลบิทอลเปลี่ยนเป็นแอล-ซอร์โบส และอะลิทอลเปลี่ยนเป็นแอล-ไซโคส ซึ่งเป็นไปตาม Izumoring ที่มีการเปลี่ยนจาก รูปแบบดีไปเป็นแอล จากการจัดจำแนก พบว่าทั้ง 5 สายพันธุ์เป็น *Gluconacetobacter* sp. พบว่าสายพันธุ์ที่ให้ค่าแอล-ซอร์โบสและไซโคสสูงสุด คือ *Gluconacetobacter* CMU 48-1 ซึ่งแยกได้จากสับปะรด *(Ananus comosus)* จากการ transformation ของดี-ซอร์บิทอลเป็นแอล-ซอร์โบส คิดเป็น 47.5% และ 67.5% ที่ดี-ซอร์บิทอล 1% และ 3% ตามลำดับ และจากการ transformation ของอะลิทอลเป็นไซโคส คิดเป็น 27.7% ที่อะลิทอล 1% จากการจัดจำแนกในระดับสปีชีสโดยใช้ลำดับกรดนิวคลีอิกของยีน 16S rRNA, PCR amplification และ 16S rRNA sequence analysis ของทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือก โดยอาศัยข้อมูลจาก GenBank จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยอาศัยยีน 16S rRNA พบว่า *Gluconacetobacter* สายพันธุ์ CMU 48-1, CMU 48-2, CMU R1-1 และ CMU Ma-2 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *Glconacetobacter liquefaciens*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved