การผลิตแซนแทนกัมจากกากมันสำปะหลังโดย

Xanthomonas campestris TISTR 840

นางสาว ธันยาภรณ์ นาวินวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-987-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF XANTHAN GUM FROM CASSAVA PULP BY *Xanthomonas campestris* TISTR 840

Miss Thanyaporn Nawinwan

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Programme of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-333-987-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตแซนแทนกัมจากกากมันสำปะหลังโดย *Xanthomonas campestris* TISTR 840
โดย	นางสาว ธันยาภรณ์ นาวินวรรณ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. ชิดพงศ์ ประดิษฐสุวรรณ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. ชิดพงศ์ ประดิษฐสุวรรณ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาสวดี ประทีปะเสน)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ธันยาภรณ์ นาวินวรรณ : การผลิตแซนแทนกัมจากกากมันสำปะหลังโดย *Xanthomonas campestris* TISTR 840 (PRODUCTION OF XANTHAN GUM FROM CASSAVA PULP BY *Xanthomonas campestris* TISTR 840) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สุเมธ ตันตระเธียร, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร. ชิดพงศ์ ประดิษฐสุวรรณ, 96 หน้า. ISBN 974-333-987-6.

กากมันสำปะหลังถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Xanthomonas campestris* TISTR 840 เพื่อใช้ในการผลิตแซนแทนกัม โดยทำการย่อยกากมันสำปะหลังให้กลายเป็นสารละลายน้ำตาลก่อนด้วยกรดหรือเอนไซม์ จากการศึกษาภาวะในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกที่แปรความเข้มข้นอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการย่อยพบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์ร่วมกับการให้ความร้อน 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 93.60 เปอร์เซ็นต์ โดยสารละลายน้ำตาลที่ได้นี้มีความเหมาะสมในการเป็นแหล่งคาร์บอนต่ำกว่าสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ผสมของแอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และเซลลูเลส และเมื่อลดปริมาณไนโตรเจน กรดซิตริก และแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อจากสูตรของRoseiroลงส่งผลให้ดัชนีความหนืดของน้ำหมักเพิ่มขึ้น โดยการผลิตแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียวซึ่งเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุงที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร กรดซิตริก 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.10 กรัม/ลิตรซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนมีความเหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมสูงสุดโดยให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักที่ 144 ชั่วโมงของการผลิตเท่ากับ 16.99 Pa $s^{0.69}$ ซึ่งให้ค่าดัชนีความหนืดมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro ที่มีสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนและให้ค่าน้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของRoseiroที่มีสารละลายน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อทำการศึกษาภาวะการตกตะกอนแซนแทนกัมพบว่าการใช้เอธานอลปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายแซนแทนกัมร่วมกับเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงที่สุดเท่ากับ 79.17 เปอร์เซ็นต์ โดยแซนแทนกัมที่ผลิตได้จากสูตรอาหารปรับปรุงมีสมบัติในการคงตัวของความหนืดเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ใกล้เคียงกับแซนแทนกัมซึ่งผลิตจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของRoseiroและแซนแทนกัมเกรดอาหาร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##3970689623 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : CASSAVA PULP / XANTHAN GUM / *Xanthomonas campestris*

THANYAPORN NAWINWAN : PRODUCTION OF XANTHAN GUM FROM CASSAVA PULP BY *Xanthomonas campestris* TISTR 840.

THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SUMATE TANTRATIAN, Ph.D.

THESIS CO-ADVISOR : CHIDPONG PRADITTASUWAN, Ph.D.

96 pp. ISBN 974-333-987-6.

Cassava pulp, used as a carbon source for *Xanthomonas campestris* TISTR 840 in xanthan gum production, was hydrolysed into sugar solution by acid and enzyme. Variation of acid concentration, temperature and time for hydrolysation with sulfuric acid, found that the 1 M sulfuric acid at 120 °c for 15 minutes gave the highest conversion of pulp to reducing sugar at 93.60 %. However, the acid hydrolysate was less appropriate for using as a carbon source than that from mixed enzyme hydrolysate. The modification of production medium found that decreasing of nitrogen, citric acid and magnesium content gave the higher viscosity index of culture broth. The best condition for xanthan production with modified media was ammonium sulfate 1 g/l, citric acid 2 g/l, magnesium sulfate 0.1 g/l and hydrolysate as a carbon source. The viscosity index of culture broth at 144 h. was 16.99 Pa $s^{0.69}$ which higher than that from Roseiro media that substituted enzymatic hydrolysate for glucose. Eventhough this viscosity index was lower than culture media of Roseiro media with glucose as carbon source. The study of precipitation conditions showed that using 2 volume of ethanol and 3 % (w/v) potassium chloride gave the highest efficiency of precipitation, was 79.17 %. The precipitant from the culture medium was precipitated and checking for properties against commercial xanthan gum. The precipitant showed the same chemical and physical character as commercial xanthan, except less viscous at the same concentration.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิตและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้โดยได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ชิดพงศ์ ประดิษฐสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาสวดี ประทีปะเสน ที่ให้คำแนะนำต่างๆรวมทั้งกรุณาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ และรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณบริษัท สำปะหลังพัฒนา จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์กากมันสำปะหลังซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบริษัท อีสเอเชียติ๊ส (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ในวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ ซึ่งให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจวัดน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของแซนแทนกัม

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ พี่ๆ และเพื่อนๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ขอบกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติผู้ใหญ่ ที่เป็นกำลังใจสำคัญอย่างยิ่งในการทำวิทยานิพนธ์นี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูป..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 วารสารปริทัศน์..... 2

2.1 กากมันสำปะหลัง..... 2

2.2 การย่อยกากมันสำปะหลัง..... 5

2.3 ลักษณะเชื้อ *Xanthomonas campestris*..... 8

2.4 โครงสร้างของแซนแทนกัม..... 11

2.5 ชีวเคมีของการผลิตแซนแทนกัมโดยเชื้อ *X. campestris*..... 12

2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแซนแทนกัมโดย *X. campestris*..... 13

2.7 สมบัติทางกายภาพของแซนแทนกัม..... 22

3 วิธีการทดลอง..... 25

3.1 วัตถุดิบ..... 25

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 25

3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง..... 27

3.4 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการทดลอง..... 27

3.5 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง..... 27

3.6 ศึกษาวิธีการเตรียมแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อ..... 27

3.7 ศึกษาการผลิตแซนแทนกัม..... 28

3.8 ศึกษาสมบัติของแซนแทนกัม..... 30

3.9 ศึกษาวิธีการตกตะกอนแซนแทนกัม..... 31

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	ผลการทดลอง	32
	4.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง	32
	4.2 ศึกษาการเตรียมแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อ	32
	4.2.1 เตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์	32
	4.2.2 เตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด	33
	4.3 ศึกษาการผลิตแซนแทนกัม	37
	4.3.1 คัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัม	37
	4.3.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแซนแทนกัม	40
	4.3.3 ศึกษาวิธีการผลิตแซนแทนกัมแบบ 2 ขั้นตอน	48
	4.3.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการผลิตแซนแทนกัมเมื่อปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	54
	4.4 ศึกษาความคงตัวของความหนืดของแซนแทนกัม	59
	4.5 ศึกษาวิธีการตกตะกอนแซนแทนกัม	61
5	วิจารณ์ผลการทดลอง	64
6	สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	75
รายการอ้างอิง		77
ภาคผนวก		81
	ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	84
	ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์	85
	ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	92
ประวัติผู้เขียน		96

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง.....	2
2	องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังเมื่อมีแหล่งที่มาของหัวมันสำปะหลังแตกต่างกัน.....	3
3	ชนิดของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสด้วยเซลลูเลส.....	8
4	สมบัติทางกายภาพของแซนแทนกัม.....	22
5	องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังที่ใช้ในงานวิจัย.....	32
6	ผลของความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก อุณหภูมิ และเวลาการย่อยต่อประสิทธิภาพกานย่อยกากมันสำปะหลัง 150 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1000 มิลลิลิตร.....	33
7	ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักที่ 144 ชั่วโมงของการผลิตแซนแทนกัมเมื่อเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแปรปริมาณสารอาหาร.....	47
8	จำนวนเซลล์มีชีวิตที่เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต.....	50
9	ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมัก ณ. ชั่วโมงที่ 144 ของการเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro และการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน.....	58
10	ประสิทธิภาพการตกตะกอนสารละลายแซนแทนกัมเมื่อแปรอัตราส่วนโดยปริมาตรของเอธานอลต่อปริมาตรสารละลายแซนแทนกัม และปริมาณโพแทสเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการตกตะกอน.....	62

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังในโรงงานขนาดใหญ่	4
2	การเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงในการย่อยแป้งด้วยกรด	7
3	ภาพถ่าย electron micrograph ของการสะสมแซนแทนกัมรอบเซลล์ *X. campestris* เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง	9
4	ภาพถ่าย electron micrograph ของแซนแทนกัมซึ่งหลุดออกจากเซลล์ *X. campestris* ลงสู่น้ำหมักเมื่อมีการกวนให้อากาศ 400 รอบ/นาที	9
5	การวิเคราะห์แซนแทนกัมจาก *X. campestris* TISTR 840 ด้วย Infrared spectroscopy	10
6	การวิเคราะห์แซนแทนกัมเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Fluka ด้วย Infrared spectroscopy	10
7	โครงสร้างของแซนแทนกัม	11
8	กลไกการสังเคราะห์แซนแทนกัม	14
9	กลไกการสังเคราะห์ lipid intermediate ของแซนแทนกัม	15
10	แผนผังการสังเคราะห์แซนแทนกัมภายในไซโตรพลาสซึม	15
11ก	ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ย่อยกากมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 100 110 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 30 และ 45 นาที	35
11ข	ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์ ย่อยกากมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 100 110 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 30 และ 45 นาที	35
11ค	ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 โมลาร์ ย่อยกากมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 100 110 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 30 และ 45 นาที	36
12ก	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในน้ำหมัก เมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และกรดเป็นแหล่งคาร์บอน	39

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

12ข การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ
X. campestris TISTR 840 โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อย
กากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และกรดเป็นแหล่งคาร์บอน..... 39
12ค ปริมาณสารตะกอนและค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ
X. campestris TISTR 840 โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อย
กากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และกรดเป็นแหล่งคาร์บอน..... 40
13ก *X. campestris* TISTR 840 ที่มีชีวิตเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
ซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณ
กรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 42
13ข *X. campestris* TISTR 840 ที่มีชีวิตเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
ซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณ
กรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 42
13ค *X. campestris* TISTR 840 ที่มีชีวิตเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
ซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณ
กรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 42
14ก น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840
ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณ
กรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 43
14ข น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840
ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณ
กรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 43
14ค น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840
ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณ
กรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 43

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

15ก ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณกรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 44
15ข ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณกรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 44
15ค ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณกรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 44
16ก ปริมาณสารตะกอนเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณกรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 45
16ข ปริมาณสารตะกอนเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณกรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 45
16ค ปริมาณสารตะกอนเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณกรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 45
17ก ดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณกรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 46
17ข ดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณกรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)..... 46

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
17ค	ดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร ที่มีการแปรปริมาณกรดซิตริก (กรัม/ลิตร) – แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร).....	46
18	จำนวนเซลล์มีชีวิตที่เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1 3 5 10 และ 15 กรัม/ลิตร.....	49
19ก	จำนวนเซลล์ *X. campestris* TISTR 840 ที่มีชีวิตในการเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียวและ 2 ขั้นตอนซึ่งแปรปริมาณเชื้อเท่ากับ 50 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์.....	51
19ข	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักเมื่อทำการผลิตแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียวและ 2 ขั้นตอนซึ่งแปรปริมาณเชื้อเท่ากับ 50 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์.....	52
19ค	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเมื่อทำการผลิตแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียวและ 2 ขั้นตอนซึ่งแปรปริมาณเชื้อเท่ากับ 50 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์.....	52
19ง	ปริมาณสารตะกอนในน้ำหมักเมื่อทำการผลิตแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียวและ 2 ขั้นตอนซึ่งแปรปริมาณเชื้อเท่ากับ 50 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์.....	53
19จ	ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อทำการผลิตแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียวและ 2 ขั้นตอนซึ่งแปรปริมาณเชื้อเท่ากับ 50 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์.....	53
20	ค่าสมมูลเคกซ์โตรสของสารตะกอนเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร กรดซิตริก 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร.....	54
21ก	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารสูตรปรับปรุงในสูตรอาหารของ Roseiro และในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน.....	56

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
21ข	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารสูตรปรับปรุง ในสูตรอาหารของ Roseiro และในสูตรอาหารของ Roseiroซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน.....	56
21ค	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารสูตรปรับปรุง ในสูตรอาหารของ Roseiro และในสูตรอาหารของ Roseiroซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน.....	57
21ง	ปริมาณสารตะกอนในน้ำหมักเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารสูตรปรับปรุง ในสูตรอาหารของ Roseiro และในสูตรอาหารของ Roseiroซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน.....	57
21จ	ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารสูตรปรับปรุง ในสูตรอาหารของ Roseiro และในสูตรอาหารของ Roseiroซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน.....	58
22ก	ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายแซนแทนกัม KELTROL® แซนแทนกัมจากการเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในสูตรอาหารของ Roseiro และแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุง.....	60
22ข	ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายแซนแทนกัม KELTROL® แซนแทนกัมจากการเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในสูตรอาหารของ Roseiro และแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุง.....	60

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
22ค	ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายแซนแทนกัม KELTROL® แซนแทนกัมจากการเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในสูตรอาหารของ Roseiro และแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุง.....	61
23	ประสิทธิภาพการตกตะกอนแซนแทนกัมเมื่อแปรปริมาตรเอธานอลต่อปริมาตรสารละลายแซนแทนกัมเท่ากับ 1 2 และ 3 ร่วมกับโพแทสเซียมคลอไรด์ 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์.....	62

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

กากมันสำปะหลังเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตแป้งมันสำปะหลัง มีปริมาณมากเนื่องจากมีอัตราการผลิตแป้งมันสำปะหลังสูงถึงปีละ 3 ล้านเมตริกตันและเป็นปริมาณกากมันสำปะหลัง 2 แสนเมตริกตัน (สมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทย, 2540) โดยกากมันสำปะหลังส่วนนี้จะถูกนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ แต่เนื่องจากกากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแป้งและไฟเบอร์ซึ่งมีคุณค่าทางอาหารต่ำจึงไม่เป็นที่นิยมแม้จะมีราคาถูกก็ตาม ทำให้กากมันสำปะหลังมีปริมาณล้นตลาดกลายเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่ยากแก่การกำจัด แต่เนื่องจากกากมันสำปะหลังมีแป้งและไฟเบอร์อยู่มากจึงมีแนวทางที่จะนำกากมันสำปะหลังมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตแซนแทนกัม โดยทำการเปลี่ยนแป้งและไฟเบอร์ในกากมันสำปะหลังให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสก่อนโดยการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดหรือเอนไซม์แล้วนำสารละลายกลูโคสที่ได้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตแซนแทนกัม

แซนแทนกัมผลิตจาก *Xanthomonas campestris* เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง เนื่องจากมีคุณสมบัติทางกายภาพพิเศษแตกต่างจากสารพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น เช่นสามารถคงความหนืดได้แม้มีการเปลี่ยนแปลงภาวะสารละลาย โดยมากแซนแทนกัมมักทำหน้าที่เป็นสารให้ความหนืด สารให้ความคงตัว และช่วยในการกระจายตัวแก่ผลิตภัณฑ์

ในการผลิตเพื่อให้ได้แซนแทนกัมที่มีคุณภาพดีและมีปริมาณสูงมีปัจจัยต่างๆที่ต้องคำนึงถึงหลายประการ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และเกลือแร่ต่างๆ ซึ่งหากใช้ในปริมาณที่เหมาะสมโดยเฉพาะการควบคุมอัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนให้มีความเหมาะสมต่อทั้งการเจริญและการผลิตแซนแทนกัมสามารถทำให้เกิดประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมสูง (Vuyst, Loo and Vandamme, 1987) นอกจากอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วสายพันธุ์เชื้อ ปริมาณหัวเชื้อ และภาวะในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งได้แก่ การควบคุมความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก และปริมาณออกซิเจนในระบบ รวมทั้งขั้นตอนในการแยกแซนแทนกัมออกจากน้ำหมักโดยการตกตะกอนแซนแทนกัมด้วยแอลกอฮอล์ ล้วนเป็นปัจจัยการผลิตที่ต้องควบคุมให้มีความเหมาะสม

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ขั้นตอนการผลิต รวมทั้งวิธีการที่เหมาะสมในการตกตะกอนแซนแทนกัม จากการเลี้ยง *X. campestris* ในสารละลายกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อให้ได้แซนแทนกัมที่มีปริมาณและคุณภาพสูง

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 กากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังหมายถึงส่วนของหัวมันสำปะหลังซึ่งเหลือเป็นกากจากการผลิตแป้งมันสำปะหลัง (กรมวิชาการเกษตร, 2526) ซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแป้งและไฟเบอร์โดยมีแป้งอยู่ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) ปริมาณองค์ประกอบของกากมันสำปะหลังนั้นจะขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของหัวมันสำปะหลังที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง (จิราภรณ์ โล่ห์วงศ์วัฒน, 2525)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
แป้ง	59.77
ไนโตรเจน	0.29
ความชื้น	9.25
Fe^{+2}	155 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
Mn^{+2}	4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
Mg^{+2}	1100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
Cu^{+2}	4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
Zn^{+2}	21 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

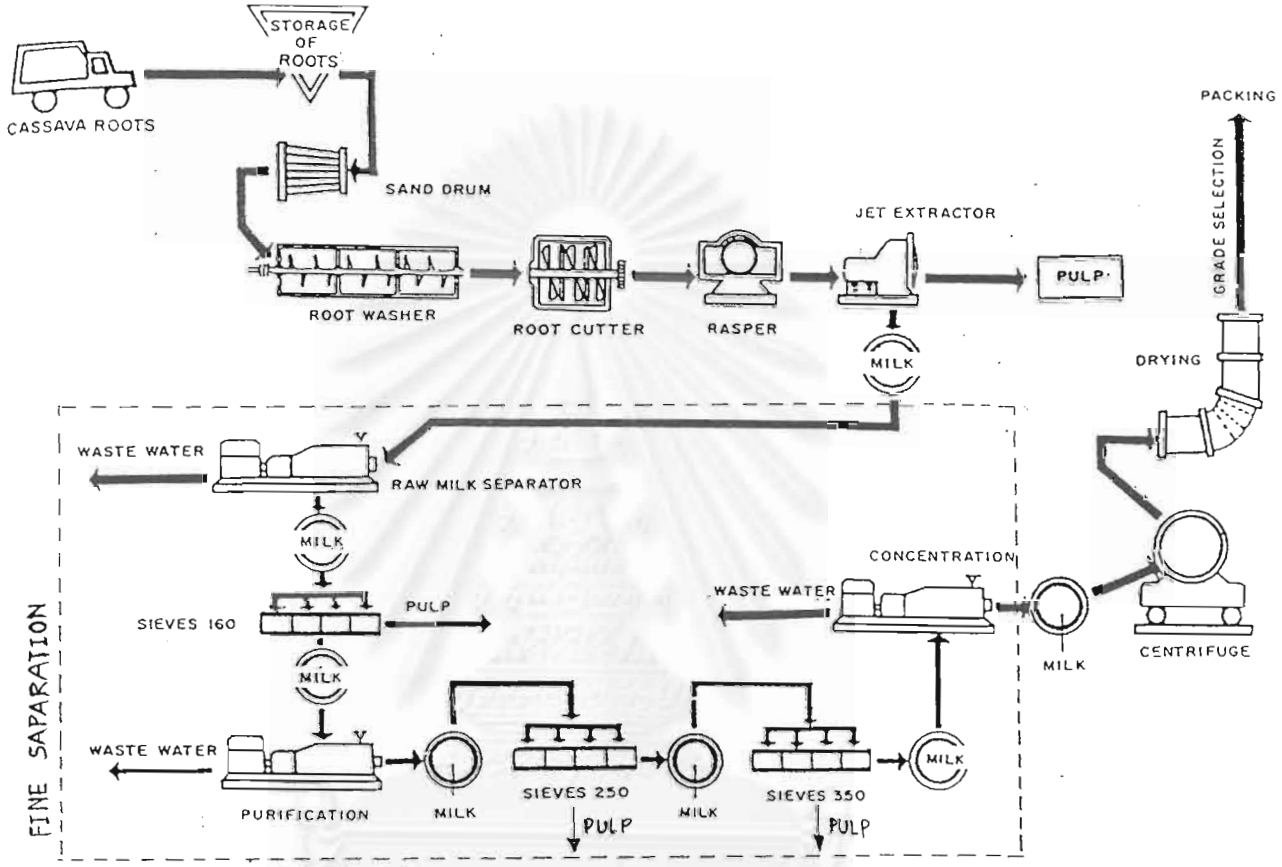
ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง เมื่อมีแหล่งที่มาของหัวมันสำปะหลังแตกต่างกัน (Thailand-USAID, 1984 อ้างถึงใน จิราภรณ์ โล่ห์วงศ์วัฒน, 2525)

	เปอร์เซ็นต์เฉลี่ย			
แหล่ง	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต	ไฟเบอร์
ภาคตะวันออก	1.77–2.53	0.27–0.52	48.72–70.07	12.56–24.13
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	1.46–2.38	0.16–0.43	50.93–70.50	12.15–21.11

ในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังนั้น กากมันสำปะหลังจะถูกแยกออกหลังจากที่หัวมันสำปะหลังซึ่งผ่านการทำความสะอาดและสับละเอียดด้วยเครื่อง Rasper (รูปที่ 1) ถูกส่งเข้าเครื่องแยกหยาบ (Jet extractor) ซึ่งจะทำการแยกกากมันออกโดยใช้หลักแรงหนีศูนย์กลาง โดยขณะที่เครื่องหมุนจะมีมันสำปะหลังเข้าสู่เครื่องตลอดเวลาพร้อมๆกับมีการฉีดน้ำและกำมะถันเข้าอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งกากมันสำปะหลังที่แยกได้จะถูกส่งต่อไปยังเครื่องอัดกากและถูกนำไปตากแห้งในลานตากพร้อมๆกับกากมันสำปะหลังส่วนที่ 2 ที่ได้จากหน่วยแยกละเอียด (Fine separation) ซึ่งทำการแยกกากมันสำปะหลังที่เหลือตกค้างในน้ำแป้งที่ผ่านการแยกกากด้วยเครื่องแยกหยาบแล้ว

ในการผลิตแป้งมันสำปะหลังแต่ละครั้งทำให้ได้กากมันสำปะหลังสูงถึง 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักหัวมันสำปะหลังสด กากมันสำปะหลังนี้จะถูกนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ แต่เนื่องจากกากมันสำปะหลังมีปริมาณโปรตีนต่ำการนำไปผลิตอาหารสัตว์ต้องมีการเติมโปรตีนและเกลือแร่ต่างๆในปริมาณมากทำให้ต้องจำหน่ายกากมันสำปะหลังให้แก่โรงงานผลิตอาหารสัตว์ในราคาถูกเพียงกิโลกรัมละประมาณ 1-2 บาท (ราคาแปรผันตามราคาหัวมันสำปะหลังสด)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังในโรงงานขนาดใหญ่ (สมาคมอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง, 2540)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การย่อยกากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแป้งและเซลลูโลสซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีการต่อกันของหน่วยกลูโคสด้วยพันธะที่ต่างกัน ในการย่อยกากมันสำปะหลังจึงมุ่งเน้นที่การทำลายพันธะขององค์ประกอบหลักทั้ง 2 นี้โดยใช้กรดหรือเอนไซม์ ซึ่งการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดหรือเอนไซม์นี้มีขั้นตอน ข้อดีและข้อเสีย รวมทั้งให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแตกต่างกัน

2.2.1 การย่อยแป้ง

แป้งประกอบด้วยอะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) อะไมโลสเกิดจากการต่อกันเป็นแนวตรงของกลูโคส 200-2000 หน่วยด้วยพันธะ α-1,4 ไกลโคซิดิก สามารถละลายน้ำได้ดี ขณะต้มมีลักษณะขุ่นและมีความหนืดต่ำ ส่วนอะไมโลเพคตินนั้นมีลักษณะเป็นกิ่งก้านแกนหลักเกิดจากการจับกันของกลูโคส 20-25 หน่วยต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 ไกลโคซิดิก และแตกกิ่งโดยการจับกันด้วยพันธะ α-1,6 ไกลโคซิดิกของน้ำตาลกลูโคส อะไมโลเพคตินนั้นเมื่อต้มจะมีลักษณะใสและมีความหนืดสูง

สำหรับการย่อยแป้งโดยทั่วไป ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การเตรียมน้ำแป้ง

เป็นขั้นตอนที่ทำให้แป้งสุกหรือเกิดเจลลาติไนเซชันโดยการต้มแป้งที่มีความเข้มข้น 25-40 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ ซึ่งแป้งจะเกิดการดูดซึมน้ำในระหว่างการให้ความร้อนทำให้เม็ดแป้งมีปริมาตรเพิ่มขึ้น 25-30 เท่า และหากมีการให้ความร้อนสูงขึ้นจะทำให้อะไมโลสแพร่ออกจากเม็ดแป้งทำให้เม็ดแป้งยุบตัวส่งผลให้แป้งละลายน้ำได้ดีขึ้นเกิดเป็นเจลที่ผันกลับไม่ได้และทำให้น้ำแป้งมีความหนืดเพิ่มขึ้น ในการเตรียมน้ำแป้งนี้นอกจากจะทำให้เม็ดแป้งแตกตัวแล้วยังทำให้โปรตีนและไขมันในแป้งถูกทำลายซึ่งจะเป็นผลดีต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย สำหรับช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำเจลลาติไนเซชันนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง โดยแป้งมันสำปะหลังมีช่วงอุณหภูมิในการเกิดเจลลาติไนเซชันเท่ากับ 60 - 70 องศาเซลเซียส (สุดจิตต์ พรหมจิตติพงศ์ และเอี่ยมอนงค์ เริงชัยชนะวงษ์, 2537)

2. กระบวนการลิเคอแฟคชัน(Liquefaction)

กระบวนการลิเคอแฟคชันเป็นขั้นตอนที่ทำให้แป้งซึ่งผ่านการเจลลาติไนเซชันแล้วมีความหนืดลดลง โดยการย่อยโมเลกุลแป้งแบบสุ่มด้วยกรดและหรือเอนไซม์ประเภท endoenzyme ในทางปฏิบัติควรย่อยแป้งให้ได้สมมูลเดกซโตรส (Dextrose equivalent:DE) เท่ากับ 10 – 15 เพื่อ

ป้องกันการรวมตัวกันของแป้งที่มีโมเลกุลใหญ่ (retrogradation) ซึ่งจะทำให้เกิดตะกอนแขวนลอยยากแก่การแยกออก (กล้าณรงค์ ศรีรอต, 2538)

3. กระบวนการแซคคาริฟิเคชัน (Saccharification)

กระบวนการแซคคาริฟิเคชันเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการย่อยแป้งขั้นสุดท้าย ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกลูโคส ในขั้นตอนนี้โดยมากมักใช้เอนไซม์ในการย่อยร่วมกับการใช้เวลาในการย่อยนานประมาณ 8-72 ชั่วโมงซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

2.2.1.1 การย่อยแป้งด้วยกรด

การใช้กรดเริ่มนำมาใช้ครั้งแรกโดย Kirchoff นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน (กล้าณรงค์ ศรีรอต, 2538) ปัจจุบันกรดที่นิยมใช้มากที่สุดได้แก่กรดซัลฟิวริกและกรดไฮโดรคลอริก โดยกรดจะทำปฏิกิริยาร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 100-180 องศาเซลเซียส ซึ่งประสิทธิภาพของการย่อยนั้นจะขึ้นกับความเข้มข้นของกรดที่ใช้ เวลา และอุณหภูมิในการย่อย ซึ่งหากใช้กรดที่มีความเข้มข้นน้อยเกินไปจะทำให้ปฏิกิริยาการย่อยดำเนินได้ช้าเกิดการย่อยที่ไม่สมบูรณ์และได้ผลิตภัณฑ์น้อย แต่หากใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีคล้ำและมีรสขม เกิดเกลือจากการปรับความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์สูงรวมทั้งเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ไม่ต้องการ เช่น เกิดสารเฟอฟูรอลจากการทำปฏิกิริยาของกลูโคสที่ได้จากการย่อยและกรดที่ใช้ (รูปที่ 2) นอกจากนี้การย่อยแป้งด้วยกรดยังเป็นการเกิดปฏิกิริยาแบบสุ่มผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่แน่นอนแม้จะควบคุมสภาวะการย่อยให้คงที่ อีกทั้งอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในกระบวนการจะต้องมีความทนการกัดกร่อนสูง เสียค่าใช้จ่ายมาก ดังนั้นในปัจจุบันจึงไม่นิยมการย่อยแป้งด้วยกรดเท่าใดนัก ส่วนใหญ่มักใช้วิธีการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ควบคู่ไปด้วย (กล้าณรงค์ ศรีรอต, 2538)

2.2.1.2 การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์

ปัจจุบันเอนไซม์ถูกนำมาใช้แทนการย่อยแป้งด้วยกรด เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยามีความจำเพาะต่อชนิดผลิตภัณฑ์ ควบคุมปฏิกิริยาง่าย ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง หรือการมีสีคล้ำหรือรสขมในผลิตภัณฑ์ รวมทั้งไม่ต้องการอุปกรณ์ที่มีความทนทานการกัดกร่อนสูงเช่นเดียวกับการใช้กรด

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งได้แก่เอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลส(amylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ เอนไซม์อะไมเลสแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ endoamylase ซึ่งทำการย่อยแป้งแบบสุ่มที่พันธะ α-(1,4) ไกลโคซิดิกทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์และเดกซตริน

เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ แอลฟ่าอะไมเลส (α- amylase) เอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสอีกประเภทหนึ่งคือexoamylaseซึ่งทำการย่อยแป้งจากปลายนอนรีดิวซ์ของโมเลกุลแป้ง เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ บีตาอะไมเลส (β-amylase) และกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ซึ่งบีตาอะไมเลสจะย่อยแป้งที่พันธะ α-(1,4) จากปลายนอนรีดิวซ์ของโมเลกุลเข้าไปทีละ 2 หน่วยกลูโคสทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลมอลโตสและเดกซตรินที่มีโมเลกุลต่ำ ส่วนกลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยแป้งจากปลายนอนรีดิวซ์เข้าไปทีละหน่วยกลูโคส โดยตัดพันธะทั้ง α-(1,4) และพันธะ α-(1,6) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

รูปที่ 2 การเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงในการย่อยแป้งด้วยกรด (อรพร เต็มวาณิชย์, 2525)

2.2.2 การย่อยเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารพอลิแซ็คคาไรด์ซึ่งทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงแก่เซลล์พืชและเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ โครงสร้างของเซลลูโลสนั้นประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายตรงด้วยพันธะ β-1,4 ไกลโคซิดิก (มนตรี จุฬาวัฒนทล, 2530) ซึ่งมีการเรียงตัวกลับไปมาเป็นมุม 180 องศา ทำให้เกิดลักษณะที่เป็นเส้นใย (fiber) ที่มีความทนทานต่อแรงดึงสูง (มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2536)โดยบริเวณที่โครงสร้างเซลลูโลสเรียงตัวไม่เป็นระเบียบเรียกว่าบริเวณ amorphous ส่วนบริเวณที่โครงสร้างมีการเรียงตัวเป็นระเบียบเรียกว่าบริเวณ crystalline ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความแข็งแรงและเป็นส่วนที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์หรือกรดในการย่อย การย่อยเซลลูโลสนิยมการใช้เอนไซม์มากกว่าการใช้กรดเนื่องจากต้องการหลีกเลี่ยงปัญหาซึ่งเกิดขึ้นเช่นเดียวกับการใช้กรดในการย่อยแป้ง สำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเซลลูโลสคือเซลลูเลส (cellulase) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ C1, C2, Cx และ β - glucosidase ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีกลไกในการย่อยและให้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 3

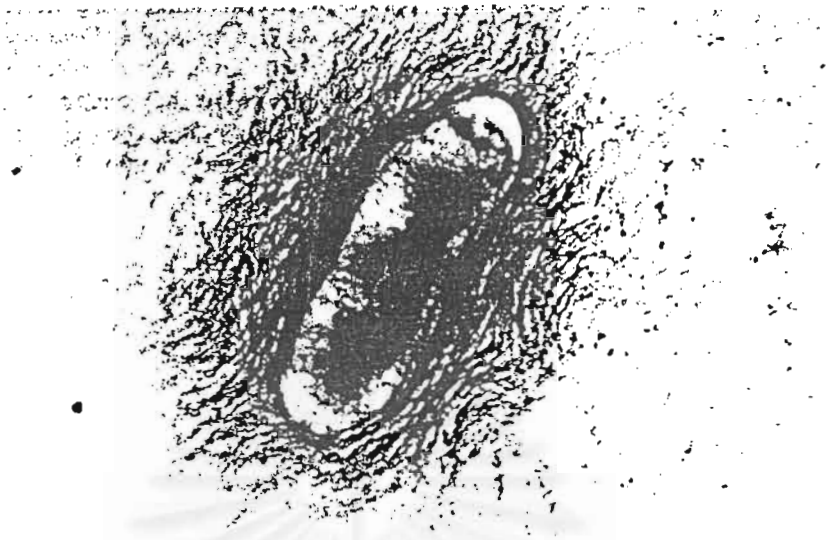
ตารางที่ 3 ชนิดของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสด้วยเซลลูเลส

เอนไซม์	สารตั้งต้น	ผลิตภัณฑ์
exo-β- glucanases (C1)	Crystalline cellulose	Oligosaccharide
cellobiohydrolase (C2)	Crystalline cellulose	Cellobiose
endo-β- glucanase (Cx)	Amorphous cellulose	Oligosaccharide
		Cellobiose, Glucose
β - glucosidase	Cellobiose	Glucose

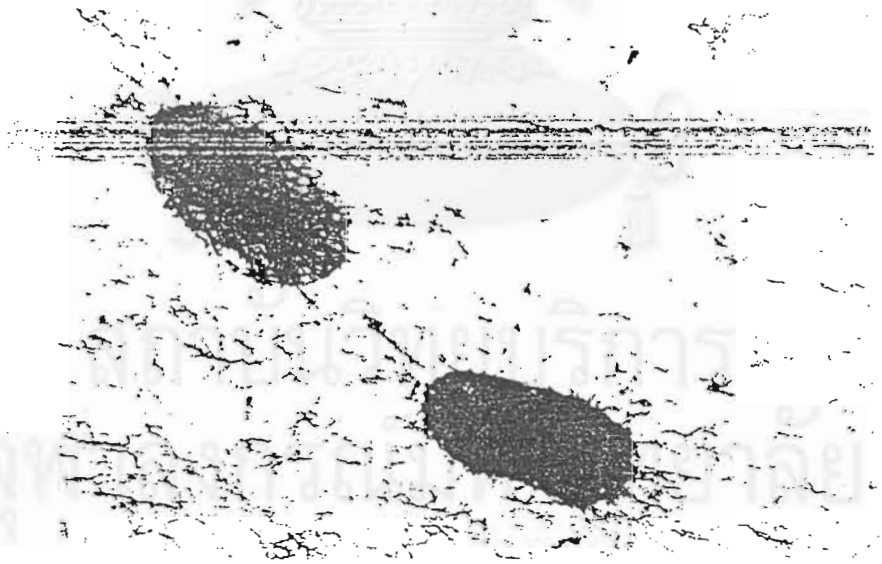
2.3 ลักษณะสมบัติ *Xanthomonas campestris*

X. campestris เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคใบจุด ใบไหม้ และโรคท่อระบบลำเลี้ยงในพืช ค้นพบครั้งแรกโดยสถาบัน NRRL (Northern Religion Research Laboratory) (Pettitt, 1979) แบคทีเรียชนิดนี้ต้องการอากาศในการเจริญ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน (rod) ขนาด 0.2 – 0.8 ไมครอน มีแฟลเจลลา (flagella) ที่ปลายข้างหนึ่งของเซลล์เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ เซลล์ย้อมติดสีแกรมลบ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งให้โคโลนีมีสีเหลืองกลมนูน ขอบเกลี้ยง (Jacob and Genstein, 1960) และมีลักษณะเป็นเมือกซึ่งเกิดจากการสะสมแซนแทนกัม รอบๆผนังเซลล์ ดังรูปที่ 3

ขนาดโคโลนีของเชื้อมีความสัมพันธ์ต่อความสามารถในการผลิตแซนแทนกัม โดยโคโลนีที่มีขนาดใหญ่จะให้ประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมสูงกว่าโคโลนีที่มีขนาดเล็ก (Remir et al., 1988 cited in Rodriguez and Aguilar, 1997) จากงานวิจัยของ ศศิธร โชติศศิธร (2536) ซึ่งทำการเลี้ยง *X. campestris* ที่มีโคโลนีขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลาง 4-5 มิลลิเมตร และโคโลนีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร พบว่าแซนแทนกัมที่ผลิตจากเชื้อที่มีโคโลนีขนาดใหญ่ให้ความหนืดสูงกว่าเชื้อที่มีโคโลนีขนาดเล็ก 2 เท่า และเมื่อเลี้ยง *X. campestris* ในอาหารเหลวที่มีการเขย่าหรือกวนเพื่อให้อากาศ แรงเฉือนจากการให้อากาศนี้จะทำให้แซนแทนกัมที่สะสมอยู่รอบๆเซลล์หลุดลงสู่น้ำหมัก (ดังรูปที่ 4) ทำให้น้ำหมักมีความหนืดเพิ่มขึ้น (Peters et al., 1989) แบคทีเรียชนิดนี้นอกจากสามารถผลิตแซนแทนกัมแล้วยังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งได้แก่ อะไมเลส (Abe et al., 1994) เพคติเนส และCMCase (Forgarty, 1983) โปรตีเอส และไลเปส (Jacob and Gerstein, 1960)

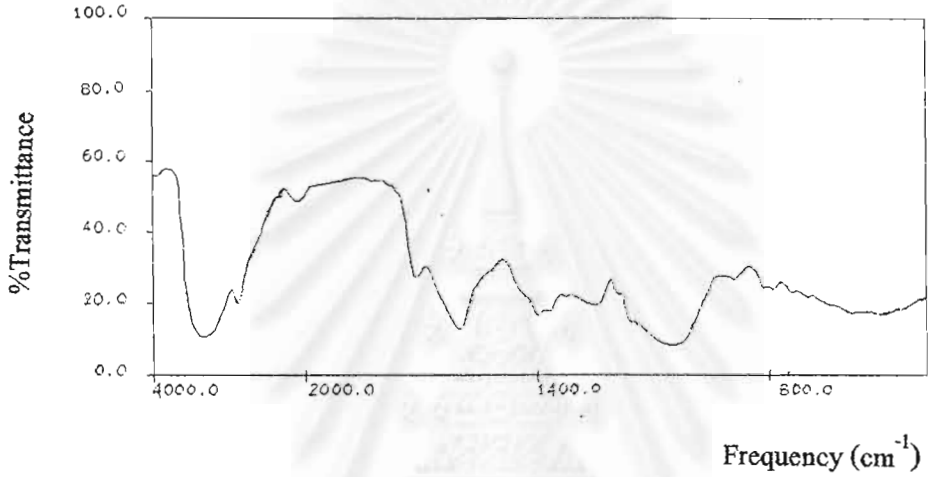


รูปที่ 3 ภาพถ่าย electron micrograph ของการสะสมแซนแทนกัมรอบเซลล์ *X. campestris* เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง (Peters et al., 1989)

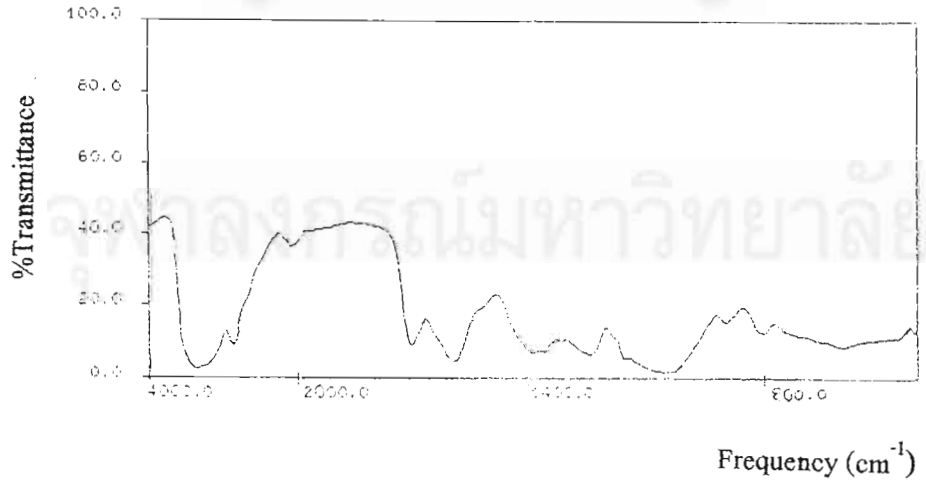


รูปที่ 4 ภาพถ่าย electron micrographของแซนแทนกัมซึ่งหลุดออกจากเซลล์ *X.campestris* ลงสู่น้ำหมักเมื่อมีการกวนให้อากาศ 400 รอบ/นาที (Peters et al., 1989)

ฆาลิศา ยุวอมรพิทักษ์ และรำไพ เกณฑ์สาคู (2537) ได้รายงานว่า *X. campestris* TISTR 840 ที่แยกได้จากถั่วเหลืองซึ่งให้โคโลนีสีเหลืองอ่อนเป็นเมือกมีลักษณะกลมขนาดใหญ่ เซลล์เป็นแท่งสั้นและย้อมติดสีแกรมลบ มีความสามารถในการผลิตแซนแทนกัมสูงที่สุดจากเชื้อทั้งหมด 30 สายพันธุ์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR 840) มีอยู่ โดยแซนแทนกัมที่ผลิตได้เป็นแซนแทนกัมชนิดเดียวกับแซนแทนกัมระดับเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Fluka เนื่องจากมีรูปแบบการผ่านแสงอินฟราเรดคล้ายคลึงกัน ดังรูปที่ 5 และ 6



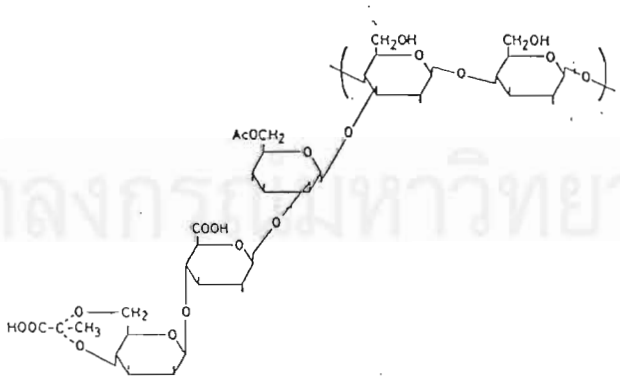
รูปที่ 5 การวิเคราะห์แซนแทนกัมจาก *X. campestris* TISTR 840 ด้วย Infrared spectroscopy (ฆาลิศา ยุวอมรพิทักษ์ และรำไพ เกณฑ์สาคู, 2537)



รูปที่ 6 การวิเคราะห์แซนแทนกัมเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Fluka ด้วย Infrared spectroscopy (ฆาลิศา ยุวอมรพิทักษ์ และรำไพ เกณฑ์สาคู, 2537)

2.4 โครงสร้างของแซนแทนกัม

แซนแทนกัมที่ *X. campestris* สร้างขึ้นมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง $2x10^6$-$5x10^7$ กรัม/โมล โดยในหนึ่งหน่วยของแซนแทนกัมประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนโนส และกรดกลูโคโรนิกในอัตราส่วน 2 : 2 :1 และมีหมู่ไพรูวิคและแอซีติกประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้ำตาลกลูโคสทั้ง 2 หน่วยทำหน้าที่เป็นแกนหลักของโครงสร้าง(backbone)โดยต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 glycosidic (ดังรูปที่ 7) ส่วนน้ำตาลแมนโนสและกรดกลูโคโรนิกทำหน้าที่เป็นกิ่งก้านของโครงสร้าง (side chain)โดยน้ำตาลแมนโนสตัวแรกจะต่อเข้ากับน้ำตาลกลูโคสของแกนหลักด้วยพันธะα-1,3 glycosidicและที่ตำแหน่ง C-6 ของแมนโนสจะมีหมู่แอซีติลเข้าเกาะอยู่ ซึ่งโดยทั่วไปแซนแทนกัมจะมีจำนวนหมู่แอซีติลใกล้เคียงกันราว 4-4.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรดกลูโคโรนิกนั้นจะเข้าจับกับน้ำตาลแมนโนสตัวแรกนี้ด้วยพันธะ β-1,2 glycosidic จากนั้นน้ำตาลแมนโนสตัวที่สองจะเข้าจับกับกรดกลูโคโรนิกนี้ด้วยพันธะ β-1,4 glycosidic โดยที่ตำแหน่ง C-4 และ C-6 ของน้ำตาลแมนโนสตัวนี้จะมีหมู่ไพรูวิลเข้าเกาะอยู่ ซึ่งแซนแทนกัมที่ผลิตจากเชื้อต่างชนิดหรือสภาวะแตกต่างกันจะมีปริมาณหมู่ไพรูวิลแตกต่างกันโดยมีค่าตั้งแต่ 0-4.5 เปอร์เซ็นต์ (Sandford et al., 1977) โดยทั่วไปโมเลกุลของแซนแทนกัมมักมีหมู่ไพรูวิลเกาะอยู่ที่น้ำตาลแมนโนสตัวที่สองของกิ่งประมาณครึ่งหนึ่งของน้ำตาลแมนโนสตัวที่สองที่มีในโมเลกุลทั้งหมด (Janson, 1975 and Sandford et al., 1977 cited in Harding, Cleary and Ielpi, 1995) ซึ่งแบบแผนการกระจายตัวของหมู่แอซีติลและไพรูวิลนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอนนัก (Harding, Cleary and Ielpi, 1995)



รูปที่ 7 โครงสร้างของแซนแทนกัม (Ielpi, Couso and Dankert, 1993)

ในช่วง 30 ปีที่ผ่านมานี้งานวิจัยในเรื่องความสำคัญของหมู่ไพรูวิลต่อคุณสมบัติทางด้านความหนืดของแซนแทนกัมมักให้ผลการทดลองที่ขัดแย้งกัน โดย Sandford และคณะ (1977) เป็นนักวิจัยกลุ่มแรกที่บุกเบิกและมีผลงานวิจัยในเรื่องนี้ชัดเจน ได้ศึกษาถึงผลของปริมาณหมู่ไพรูวิลที่แตกต่างกันในสารละลายแซนแทนกัมที่มีความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความหนืดของสารละลายแซนแทนกัมนั้นแปรผันตามปริมาณหมู่ไพรูวิลที่มี แต่หากสารละลายแซนแทนกัมมีความเข้มข้นต่ำกว่า 2-4 เปอร์เซ็นต์การเพิ่มปริมาณหมู่ไพรูวิลจะทำให้ความหนืดของสารละลายลดลง

ต่อมาในปี 1981 Smith, Symes และ Lawson ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของหมู่ไพรูวิลต่อความหนืดของสารละลายแซนแทนกัมในรูปintrinsic viscosityโดยใช้ตัวอย่างที่มีปริมาณหมู่ไพรูวิลแตกต่างกัน 6 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณหมู่ไพรูวิลไม่มีความสัมพันธ์ต่อความหนืดของสารละลายแซนแทนกัม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Torres และคณะ (1993) และ Rodriguez และ Aguilar (1997) ซึ่งรายงานว่าเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตแซนแทนกัมซึ่งมีปริมาณหมู่ไพรูวิลสูงสุด ให้ความสามารถในการให้ความหนืด (viscosity ability) และ intrinsic viscosity ต่ำที่สุด และเชื้อที่มีความแปรปรวนในงานวิจัยของ Torres และคณะ (1993) ซึ่งผลิตแซนแทนกัมมีปริมาณหมู่ไพรูวิลน้อยกว่าแซนแทนกัมทางการค้ากลับให้ความหนืดที่ไม่แตกต่างกัน

2.5 <u>ชีวเคมีของการผลิตแซนแทนกัมโดย *X. campestris*</u>

กระบวนการทางชีวเคมีในการสังเคราะห์แซนแทนกัมเกิดขึ้นในไซโทพลาซึมของเซลล์แบคทีเรีย และมีการขับแซนแทนกัมออกนอกเซลล์โดยการควบคุมของ xanthan polysaccharide synthesis (xps) gene (Harding, Cleary and Ielpi, 1995)

การสังเคราะห์สารพอลิแซ็คคาไรด์ แบ่งได้เป็น 4 ขั้นตอนด้วยกัน คือ 1. การดูดซึมสารอาหารเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย 2. การเกิดเมแทบอลิซึม 3. การเกิดสารพอลิแซ็กคาไรด์ 4. การขับสารพอลิแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์ โดยสารอาหารจะถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียและมีการเคลื่อนย้ายหมู่ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการฟอสฟอรีเลชัน (phosphorylation) ทำการย่อยสลายและสังเคราะห์สารพอลิแซ็กคาไรด์โดยอาศัยน้ำตาลจากนิวคลีโอไทด์หลายชนิดนำมาเติมและเรียงต่อกันในตำแหน่งที่ถูกต้อง โดยมีไอโซปรินอยด์ (isoprenoid) และแอลกอฮอล์ฟอสเฟตเป็นตัวนำ ซึ่งสารพอลิแซ็คคาไรด์จะถูกขับออกจากเซลล์โดยผ่านเซลล์เมมเบรน(membrane)และผนังเซลล์ (อรพิน ภูมิภมร, 2526)

Pettitt (1978) เสนอว่ากลไกการสังเคราะห์แซนแทนกัมมี 3 ขั้นตอน คือ 1.จุลินทรีย์ใช้น้ำตาลในรูปสารอาหารผ่านกระบวนการ phosphorylation 2. น้ำตาลที่ถูกย่อยแล้วผ่านเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์แซนแทนกัมโดยการactivated monosaccharide จากsugar nucleotide ไปยังตำแหน่งและลำดับที่ถูกต้อง 3. หมู่แอซีติลและไพรูวิลจะเข้าจับกับโมเลกุลของแซนแทนกัมและเคลื่อนที่มายังผิวเซลล์และถูกขับออกสู่ภายนอก

Leigh และ Coplin (1992) และ Harding, Cleary และ Ielpi (1995) เสนอว่าการสังเคราะห์แซนแทนกัมประกอบด้วย 4 ขั้นตอนด้วยกัน คือ

1. สารอาหารในรูปน้ำตาลผ่านเข้าสู่ภายในไซโทพลาซึมของเซลล์ จากนั้นจะเกิดการสังเคราะห์น้ำตาลไดฟอสเฟต (sugar nucleotide diphosphate) ผ่าน Pentose Phosphate Pathway และ Entner – Doudoroff Pathway (รูปที่ 8)

2. sugar nucleotideถูกต่อเข้ากับสารตัวรับคือ polyprenol เพื่อสังเคราะห์ lipid intermediate โดยการต่อกันของ sugar nucleotide ชนิดต่างๆในลำดับและตำแหน่งที่ถูกต้อง (รูปที่ 9)

3. หมู่ไพรูวิล และ หมู่อะซิติล ที่ได้จาก Phosphoenolpyruvate และ Acetyl~CoA ถูกต่อเข้ากับโมเลกุลของแซนแทนกัม

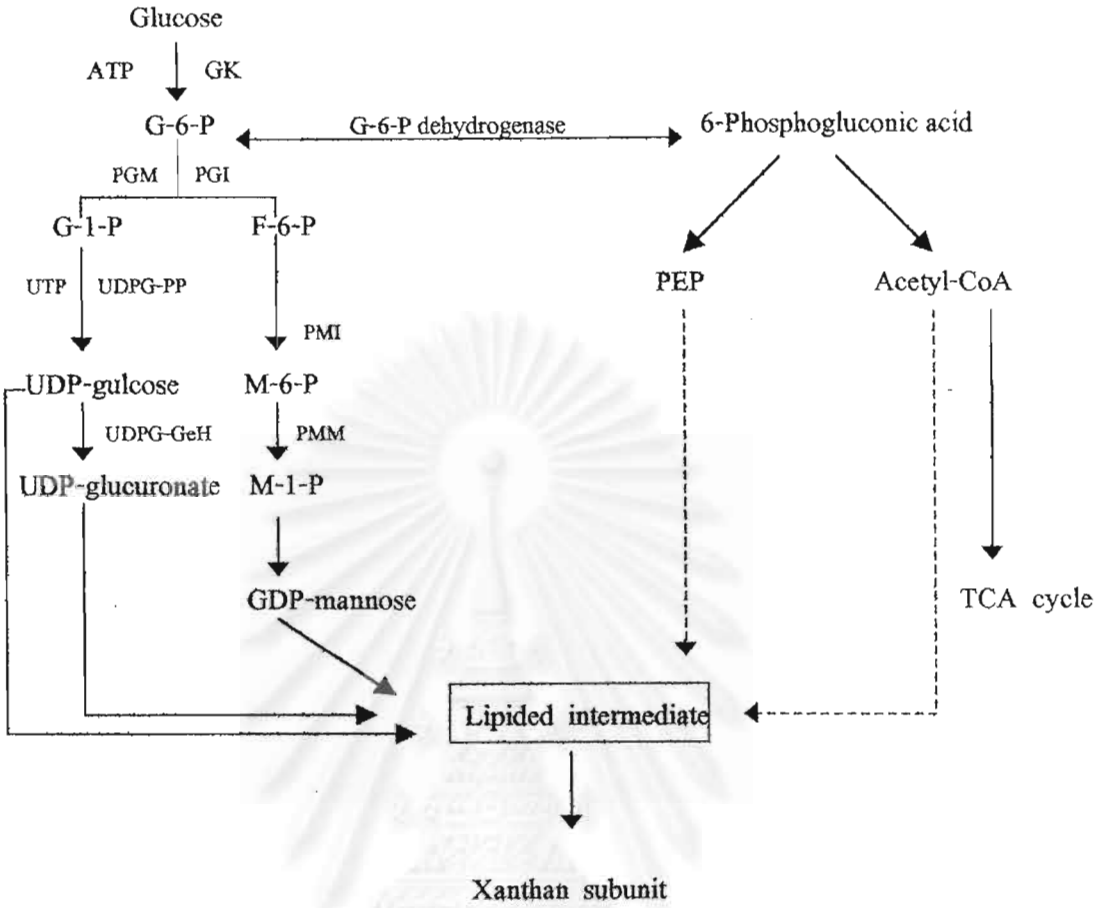
4.แซนแทนกัมถูกเคลื่อนย้ายออกจากเซลล์เยื่อของเชื้อโดยอาศัยเอนไซม์พอลิเมอร์เรส (polymerase) (รูปที่ 8)

2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแซนแทนกัมโดย *X. campestris*

2.6.1 แหล่งอาหาร

2.6.1.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญต่อการผลิตแซนแทนกัมมากกว่าการเจริญของเชื้อ (Moraine and Rogovin, 1966) โดยแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ คือ น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์ รองมาคือน้ำตาลซูโครสแต่มักให้ประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมต่ำกว่า ซึ่ง Vuyst และ Vermeire (1994)ได้รายงานว่าเมื่อทำการผลิตแซนแทนกัมในระดับถังหมักโดยแปรชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้ Corn Steep Liquor (CSL) เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 4 เปอร์เซนต์ กากน้ำตาล (molasses) 10 เปอร์เซ็นต์ หรือ Sirodex A (glucose syrup) 2.8 เปอร์เซ็นต์อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งเมื่อพิจารณาปริมาณแซนแทนกัมที่ผลิตได้และการให้ความหนืดแล้ว พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส 4 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอน



GK : Glucokinase

PGM : Phosphoglucomutase

PGI : Phosphoglucose isomerase

UDPG-PP : UDP-glucose pyrophosphorylase

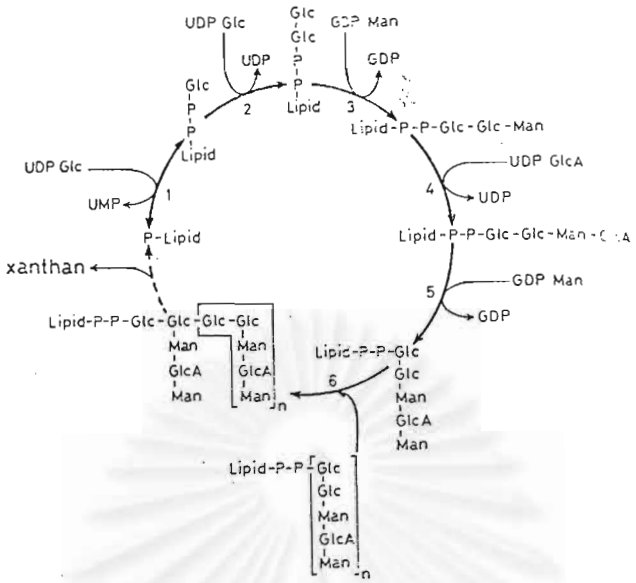
UDPG-GeH : UDP-glucose dehydrogenase

PMI : Phosphomannose isomerase

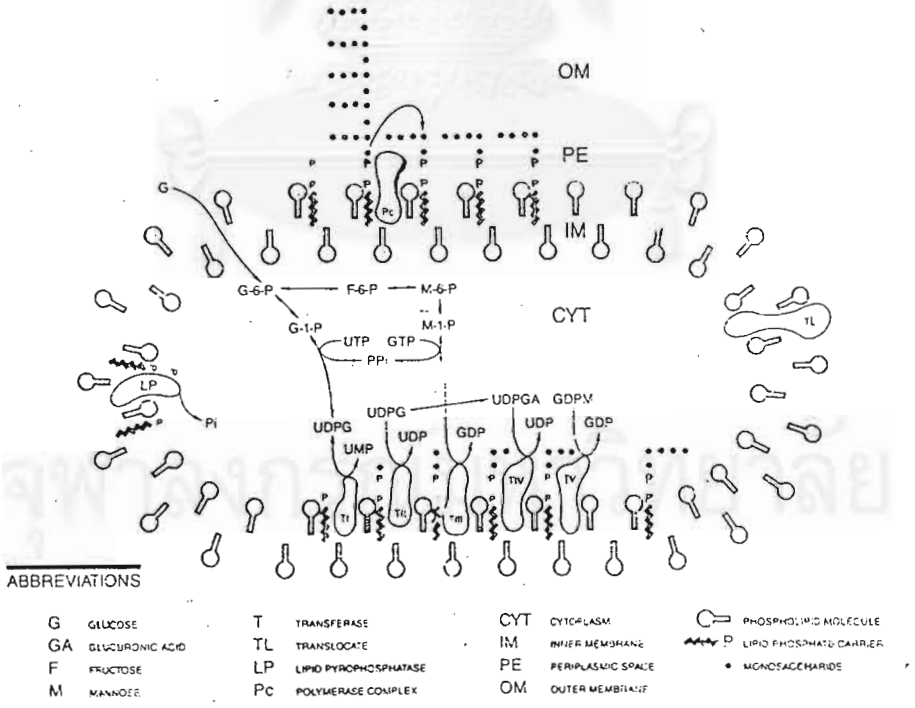
PMM : Phosphomannomutase

G-6-P dehydrogenase : Glucose-6-Phosphate dehydrogenase

รูปที่ 8 กลไกการสังเคราะห์แซนแทนกัม (Roseiro et al., 1993)



รูปที่ 9 กลไกการสังเคราะห์ Lipid-intermediate ของแซนแทนกัม (Ielpi, Couso and Dankert, 1993)



รูปที่10 แผนผังการสังเคราะห์แซนแทนกัมภายในไซโตรพลาสซึม (Harding, Cleary and Ielpi, 1995)

มีความเหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมมากที่สุด โดยสามารถผลิตแซนแทนกัมได้ 22 กรัม/กิโลกรัมอาหารเลี้ยงเชื้อและให้ความหนืดเท่ากับ 1400 mPa s ในขณะที่ Rogovin, Anderson และ Cadmus (1961) รายงานว่า *X. campestris* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้สูงสุดเพียง 2.5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น แม้จะให้น้ำตาลมากกว่านี้ก็จะไม่ส่งผลต่อการผลิตแซนแทนกัมแต่อย่างใด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Rogovin, Albrecht และSohns (1965) ซึ่งหลังจากที่ทำการเลี้ยง *X. campestris* B-1459 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตแซนแทนกัมได้สูงสุดเท่ากับ 1.6 เปอร์เซ็นต์โดยไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้มากกว่านี้ แม้จะมีการเพิ่มปริมาณน้ำตาลเข้าสู่ระบบอีกเป็นระยะๆ เนื่องจากเกิดการขัดขวางการแพร่อากาศและสารอาหารเข้าสู่เซลล์จากการเพิ่มความหนืดของน้ำหมัก แต่หากมีการเพิ่มปริมาณน้ำตาลก่อนที่จะเกิดการสร้างแซนแทนกัมคือก่อน 96 ชั่วโมงของการเลี้ยงจะสามารถเพิ่มการผลิตแซนแทนกัมได้อีก ดังเช่นในการทดลองของ Hitoshi, Toshiomi และ Hisaharu (1987) ซึ่งทำการเลี้ยง *X. campestris* ATCC 13951 ในถังหมักขนาด 10 ลิตรที่มีการให้อากาศและควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในช่วง Production phase 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงให้มีค่าระหว่าง 30-40 กรัม/กิโลกรัมน้ำหมัก (Weiss และ Ollis (1980) รายงานว่าการสร้างแซนแทนกัมเป็นแบบ non-growth association คือไม่ขึ้นกับการเจริญของเชื้อ โดยแซนแทนกัมจะถูกสร้างตั้งแต่ปลาย log phase จนถึง stationary phase) และสามารถผลิตแซนแทนกัมได้มากถึง 42 กรัม/กิโลกรัมน้ำหมักที่ 96 ชั่วโมงของการเลี้ยงโดยไม่เกิดการยับยั้งการผลิตแซนแทนกัม ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อไม่มีการควบคุมปริมาณน้ำตาลกลูโคสในระบบ

นอกจากน้ำตาลกลูโคสแล้ว Rogovin และคณะ (1961) ยังพบสารอื่นที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัม คือ corn sugar และแป้ง (Weber and Horan, 1966) ซึ่ง McNeely (1969) ได้รายงานว่าการใช้แป้งข้าวเจ้าในการเลี้ยงเชื้อช่วยให้ *X. campestris* เจริญได้ดีและสร้างแซนแทนกัมได้สูง แต่การใช้แป้งข้าวเจ้าต้องเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อนโดยใช้เอนไซม์ย่อย ซึ่ง Slodki และ Cadmus (1978) รายงานว่าปริมาณสารคาร์โบไฮเดรตที่ใช้สามารถแปรผันได้ตั้งแต่ 2-5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นอยู่กับชนิดและระยะเวลาในการหมัก โดยจะสามารถผลิตสารพอลิแซ็คคาไรด์ได้ประมาณ 40-75 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลที่ใช้

McNeely (1969) รายงานว่าการผลิตแซนแทนกัมจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หรือไม่นั้นทราบได้โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมัก หากพบว่าเหลือน้อยกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงว่าได้เกิดการผลิตแซนแทนกัมอย่างสมบูรณ์แล้ว

2.6.1.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญโดยตรงต่อการเจริญของเชื้อ (Moraine and Rogovin, 1966) ซึ่งการกระตุ้นให้เชื้อมีการเจริญสูงจะส่งผลให้อัตราการผลิตแซนแทนกัมเพิ่มขึ้นด้วย โดยspecific rateของการผลิตแซนแทนกัมนั้นจะขึ้นกับความเข้มข้นมากกว่าชนิดของไนโตรเจนที่ใช้ (Pinches and Pallent, 1986) Molina, Fitzsimons และ Perotti (1993) รายงานว่าการเลี้ยง *X. campestris*ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้ CSL 1 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้เชื้อสามารถผลิตแซนแทนกัมเพิ่มขึ้นจากเดิมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน 22 เปอร์เซ็นต์และสามารถช่วยลดเวลาในการผลิตให้สั้นลงได้ (Whister and Bemiller, 1973 ; Molina Fitzsimons and Perotti, 1993) Roseiro และคณะ (1993) รายงานว่าในการเลี้ยง *X. campestris* NRRL B-1459 ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 30 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน การลดปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลือ 2.5 มิลลิโมล/ลิตรทำให้เชื้อมีเมแทบอลิซึมมากขึ้น โดยทำให้เอนไซม์ G-6-Pdehydrogenase Phosphomannose isomerase และ UDP-glucose dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์มีความที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแซนแทนกัมมีกิจกรรมสูงขึ้น (รูปที่ 8) ส่วน Peters และคณะ (1989) เสนอว่าสามารถใช้ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากที่สุดเท่ากับ 37.88 มิลลิโมล/ลิตรจึงจะเป็นปริมาณที่มีความเหมาะสมพอดีต่อการเจริญของ *X. campestris* NRRL B-1459 SH-LIIโดยที่เชื้อสามารถใช้ไนโตรเจนได้หมดพอดีเมื่อเริ่มเจริญเข้าสู่ช่วงการผลิตแซนแทนกัมแล้ว

แหล่งของสารไนโตรเจนที่นิยมใช้ในการผลิตแซนแทนกัมได้แก่เปปโตน โซเดียมกลูตาเมท (Pinches and Pallent, 1986) แอมโมเนียมไนเตรท (McNeely, 1969) Corn Steep Liquor (CSL) (Vuyst, Loo and Vandamme, 1987 ; Vuyst and Vermeire, 1994) โปรตีนจากถั่วเหลือง (Lilly et al., 1958) ส่วนการใช้ dried distiller's soluble อาจมีผลทำให้แซนแทนกัมที่ผลิตได้มีสีเข้ม (Cadmus et al., 1976)

Moraine และ Rogovin (1966) รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสนั้นมีความสำคัญต่อการผลิตแซนแทนกัมขณะที่ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อ การมีปริมาณไนโตรเจนหรือคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มากหรือน้อยเกินไปย่อมส่งผลต่อทั้งการเจริญและการผลิตแซนแทนกัม ดังนั้นการกำหนดอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อทั้งการเจริญและการผลิตแซนแทนกัมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตได้ ซึ่ง Vuyst, Loo และ Vandamme (1987) เสนอว่าควรทำการผลิตแซนแทนกัมเป็นแบบ 2 ขั้นตอน โดยช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อควรใช้สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในระดับต่ำเพื่อให้เกิดการเจริญของเชื้อสูง จากนั้นจึงนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างแซนแทนกัม ซึ่งเมื่อทำการทดลองเลี้ยง *X. campestris* NRRL-B-1459 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

น้ำตาลซูโครส 40 กรัม/ลิตร และ corn steep liquor (CSL) 20 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 25 ชั่วโมงจึงถ่ายลงอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมีน้ำตาลซูโครส 40 กรัม/ลิตร และ CSL 10 กรัม/ลิตร พบว่า เมื่อถ่ายเชื้อลงในขั้นตอนที่ 2 แล้วไม่เกิดการสร้างเซลล์จุลินทรีย์ขึ้นอีก และเมื่อเลี้ยงได้ 96 ชั่วโมงสามารถผลิตแซนแทนกัมได้สูงถึง 28 กรัม/กิโลกรัมน้ำหมัก โดย Roseiro และคณะ (1992) ได้เสนอว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 23 เป็นสัดส่วนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมมากที่สุดโดยสามารถผลิตแซนแทนกัมได้ 11.15 กรัม/ลิตร ซึ่งหากใช้สัดส่วนที่สูงกว่านี้ (ใช้ปริมาณไนโตรเจนน้อยกว่า 7.58 มิลลิโมล/ลิตร) จะทำให้ปริมาณไนโตรเจนไม่เพียงพอต่อการเจริญ ซึ่งจะส่งผลให้เชื้อผลิตแซนแทนกัมได้น้อยลงด้วย

2.6.1.3 แหล่งเกลือแร่

นอกจากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแล้วจุลินทรีย์ยังต้องการเกลือแร่ต่างๆในการเจริญและสร้างแซนแทนกัม ซึ่งเกลือแร่เหล่านี้แม้จะเป็นสารอาหารที่ต้องการในปริมาณน้อยแต่ก็ขาดไม่ได้ โดยเกลือแร่ต่างๆจะทำหน้าที่เป็น cofactor และเป็นองค์ประกอบของ coenzyme ในเมแทบอลิซึมของเชื้อ (Roseiro et al., 1992) ถ้าปริมาณเกลือแร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เหมาะสมอาจทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างแซนแทนกัมได้ ซึ่ง Roseiro et al. (1993) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *X. campestris* NRRL-B-1459 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน การลดปริมาณแมกนีเซียมและซัลเฟอร์ในอาหารลงเหลือ 0.2 มิลลิโมล/ลิตร และ 0.41 มิลลิโมล/ลิตรตามลำดับทำให้เชื้อมีการเจริญสูงขึ้นแต่การสร้างแซนแทนกัมลดลง

สำหรับสารอาหารเกลือแร่ส่วนใหญ่นิยมใช้ในรูปของเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เฟอริกคลอไรด์ และเกลือแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นต้น การเติมกรดอินทรีย์บางชนิด เช่น ซัคซิเนท ไพรูเวท ซิเตรท และแอลฟาคีโตกลูตาเรท ร่วมด้วยในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัม โดย Souw และ Demain (1979) เสนอว่าการใช้ซัคซิเนท 0.6 เปอร์เซ็นต์ ไพรูเวท 0.3 เปอร์เซ็นต์ และแอลฟา-คีโตกลูตาเรท 0.4 เปอร์เซ็นต์อย่างใดอย่างหนึ่งในการเลี้ยงเชื้อช่วยส่งเสริมให้การผลิตแซนแทนกัมดีขึ้น ส่วน Jana และ Ghosh (1995) รายงานว่ากรดซิตริกซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานในการสร้างแซนแทนกัมของเชื้อ โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบการหมักแบบต่อเนื่องการเพิ่มความเข้มข้นของกรดซิตริกที่ใช้ทำให้การสร้างแซนแทนกัมเพิ่มจาก 3.4 กรัม/ลิตร เป็น 7.6 กรัม/ลิตรโดยไม่ทำให้ปริมาณของเชื้อเพิ่มขึ้น แต่ไม่ควรใช้กรดซิตริกในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 5 กรัม/ลิตรเมื่อทำ

การผลิตในระบบการหมักแบบต่อเนื่องและไม่ควรใช้กรดซิตริกเกิน 6 กรัม/ลิตรในระบบการหมักแบบกะ เนื่องจากจะทำให้ประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมลดลง ขณะที่ Roseiro และคณะ (1992) รายงานว่าสามารถลดปริมาณกรดซิตริกในอาหารเลี้ยงเชื้อลงจนเหลือ 2 กรัม/ลิตรได้โดยไม่ส่งผลต่อการสร้างแซนแทนกัมของเชื้อแต่หากลดปริมาณกรดซิตริกลงมากกว่านี้จะทำให้การผลิตแซนแทนกัมลดลง ส่วน Kennedy และ Bradshaw (1984) ซึ่งอ้างถึงใน Vuyst และ Vermeire (1994)ได้รายงานว่ากรดซิตริกจะช่วยเพิ่มการละลายของแคลเซียมและ Iron salt ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอสเฟตและช่วยกระตุ้นการเกิดกิจกรรมของวัฏจักรเครป (Kreb's cycle)ให้มีมากขึ้น

2.6.2 ความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสิ่งที่ต้องควบคุมให้เกิดความเหมาะสมในระหว่างการผลิตแซนแทนกัม หากความเป็นกรดด่างของน้ำหมักลดต่ำกว่าจุดวิกฤตคือประมาณ 5.0 จะทำให้เชื้อสร้างแซนแทนกัมได้น้อยลง ซึ่งในระหว่างการผลิตแซนแทนกัมค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักลดลงเนื่องจากเกิดความเป็นกรดจากองค์ประกอบภายในของโมเลกุลแซนแทนกัมซึ่งเชื้อผลิตขึ้น ได้แก่ กรดกลูโคโรนิก หมู่แอซีติล และหมู่ไพรูวิล (Pettitt, 1979) ดังนั้นในระหว่างการผลิตแซนแทนกัมควรควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักให้อยู่ในช่วง 6.0-7.5 (Kang and Cottrell, 1979 cited in Pettitt, 1979)

2.6.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิในระหว่างการเลี้ยงเชื้อเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อทั้งการเจริญและการผลิตแซนแทนกัม โดย Harding, Cleary และ Ielpi (1995) เสนอว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแซนแทนกัมแตกต่างกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *X. campestris* ควรอยู่ระหว่าง 24-27 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 30-33 องศาเซลเซียสมีความเหมาะสมต่อการสร้างแซนแทนกัม ส่วน Chin และ Shang(1990)ได้เสนอว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมควรอยู่ในช่วง 30-33 องศาเซลเซียส ซึ่งจะช่วยให้การผลิตแซนแทนกัมมีประสิทธิภาพสูงถึง 90 เปอร์เซนต์

2.6.4 การให้อากาศ

ปริมาณอากาศหรือออกซิเจนมีความสัมพันธ์ต่อประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมและการเจริญของเชื้อ เมื่อเชื้อสร้างแซนแทนกัมมากขึ้นทำให้น้ำหมักมีความหนืดสูงขึ้น ความหนืดที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวขัดขวางการแพร่กระจายของอากาศเข้าสู่เซลล์ ส่งผลให้การสร้างแซนแทน

กัมลดลง สำหรับการเพิ่มอากาศให้แก่เชื้อนั้นทำได้โดยการเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่าหรือการปรับปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงแบบเขย่า และเพิ่มอัตราการกวนของใบพัดหรือเพิ่มอากาศเข้าสู่ระบบเมื่อเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมัก Salam, Fadel และ Murad (1994) รายงานว่าการเลี้ยง *X. campestris* E-NRC-3ในระดับขวดเขย่าปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตรซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนอากาศต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3:2 จะให้ประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมมากที่สุดโดยสามารถผลิตแซนแทนกัมได้เท่ากับ 70.5 กรัม/ลิตร ขณะที่ Peters และคณะ (1989) ได้รายงานว่าเมื่อผลิตแซนแทนกัมในถังหมักขนาด 15 ลิตรโดยใช้อัตราการกวนของใบพัดสูงจะทำให้ออกซิเจนในระบบมีมากส่งผลให้เชื้อสามารถสร้างแซนแทนกัมได้มากขึ้น และแซนแทนกัมที่สร้างได้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น โดยเมื่อให้อัตราการกวน 800 รอบ/นาทีสามารถผลิตแซนแทนกัมที่มีน้ำหนักโมเลกุล $8.6x10^6$ กรัม/โมลได้ 16.4 กรัม/ลิตร ในขณะที่เมื่อใช้อัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบ/นาทีผลิตแซนแทนกัมได้เพียง 6.3 กรัม/ลิตรและแซนแทนกัมที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ $6.9x10^6$ กรัม/โมล และหากมีการกวนร่วมกับการให้อากาศเข้าสู่ระบบจะสามารถช่วยลดอัตราการกวนที่ต้องใช้ลงได้ครึ่งหนึ่ง โดยเชื้อสามารถสร้างแซนแทนกัมได้ในปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลที่สูงขึ้น ซึ่งเมื่อใช้อัตราการกวนของใบพัดเท่ากับ 400 รอบ/นาทีร่วมกับการให้อากาศ 0.33 vvm ทำให้เชื้อสามารถผลิตแซนแทนกัมที่มีมวลโมเลกุล $8.8x10^6$ กรัม/โมลได้ถึง 18.9 กรัม/ลิตร Galindo, Salcedo และ Ramirez (1994) เสนอว่าอากาศมีผลต่อแซนแทนกัมในด้านคุณภาพมากกว่าปริมาณ โดยได้ทำการทดลองเลี้ยง *X. campestris* ในขวดรูปชมพู่ 2 ชนิด คือ baffle Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร และ conventional Fernbach flask ขนาด 2800 มิลลิลิตร ซึ่งพบว่าการเจริญของเชื้อและการสร้างแซนแทนกัมไม่มีความแตกต่างกัน แต่การเลี้ยงเชื้อใน baffle flask ซึ่งมีการส่งผ่านออกซิเจนดีกว่าสามารถผลิตแซนแทนกัมที่มีความหนืดสูงกว่าแซนแทนกัมที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อใน conventional flask 3 เท่า

2.6.5 อายุและปริมาณหัวเชื้อ

Pinches และ Pallent (1986) และ Harding, Cleary และ Ielpi (1995) ได้รายงานว่าแซนแทนกัมเป็นสารทุติยภูมิซึ่ง *X. campestris* สร้างขึ้นที่ปลาย log phase จนถึง stationary phase ของการเจริญ ดังนั้นหัวเชื้อที่นำมาใช้ในการผลิตควรมีการเจริญอยู่ในช่วงกลาง log phase ซึ่งมีอายุประมาณ 24-48 ชั่วโมง ส่วนปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมส่วนใหญ่นิยมใช้ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรหัวเชื้อ/ปริมาตรการผลิต)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6.6 การแยกแซนแทนกัมออกจากน้ำหมัก

การแยกแซนแทนกัมออกจากน้ำหมักเป็นขั้นตอนที่สูญเสียค่าใช้จ่ายมากกว่า50 เปอร์เซ็นต์ของค่าใช้จ่ายทั้งหมดในการผลิตแซนแทนกัม (Gonzales et al., 1989 ; Albiter, Torres and Galindo, 1994) โดยต้องทำการแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกจากน้ำหมักก่อนด้วยการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1-10 เท่าเพื่อลดความหนืด จากนั้นจึงทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเอาเซลล์ออก แล้วนำส่วนใสที่ได้ตกตะกอนแซนแทนกัมด้วยแอลกอฮอล์ เช่น เอธานอล เมธานอล และไอโซโพรพานอล ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้เอธานอลมากที่สุด เนื่องจากแซนแทนกัมที่ตกตะกอนด้วยเอธานอลมีความปลอดภัยในระดับที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ (Gonzales et al., 1989) การใช้แอลกอฮอล์ในการตกตะกอนแซนแทนกัมนิยมใช้ในอัตราส่วน 2-3 เท่าต่อปริมาตรของน้ำหมักที่ผ่านการเจือจางและแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกแล้ว โดยทำการตกตะกอนแซนแทนกัมร่วมกับเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์หรือเกลือโซเดียมคลอไรด์ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารอิเล็กโทรไลต์ ซึ่งการใช้อัตราส่วนแอลกอฮอล์ต่อปริมาตรน้ำหมักสูงแม้จะให้ประสิทธิภาพในการตกตะกอนสูง แต่จะทำให้ต้นทุนการผลิตแซนแทนกัมสูงขึ้นตามด้วย Galindo และ Albiter (1996) รายงานว่าหากเพิ่มปริมาณสารอิเล็กโทรไลต์ที่ใช้ในการตกตะกอนแซนแทนกัมมากขึ้นสามารถลดอัตราส่วนของแอลกอฮอล์ที่ใช้ลงได้ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์จาก 2 เป็น 3 เปอร์เซ็นต์สามารถลดอัตราส่วนแอลกอฮอล์ต่อน้ำหมักจาก 2:1 เหลือ 1:1.4 โดยให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนใกล้เคียงกัน เมื่อการตกตะกอนมีประสิทธิภาพสูงนอกจากจะทำให้เก็บเกี่ยวผลผลิตได้สูงแล้วยังทำให้แซนแทนกัมที่ตกตะกอนได้มีความบริสุทธิ์สูงด้วย Albiter, Torres และ Galindo (1994) รายงานว่าเมื่อทำการตกตะกอนแซนแทนกัมในระบบถังปฏิกรณ์โดยใช้ใบพัดแบบ Marine impeller และ Rushton turbineในการกวนผสมแอลกอฮอล์และน้ำหมักและใช้อัตราส่วนแอลกอฮอล์ต่อน้ำหมัก 1:2 โดยปริมาตรร่วมกับการใช้เกลือโพแทสเซียมคลอไรด์มากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถตกตะกอนแซนแทนกัมได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังนั้นการใช้เกลือโพแทสเซียมคลอไรด์เพียง 3 เปอร์เซ็นต์จึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนแล้ว ซึ่งการตกตะกอนแซนแทนกัมด้วยการกวนผสมด้วย Marine impeller นั้นให้ปริมาณแซนแทนกัมที่ต่ำกว่าการใช้ Rushton turbine แต่แซนแทนกัมที่ได้กลับมีความบริสุทธิ์สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และในการกวนผสมนั้นควรใช้อัตราในการกวนต่ำเนื่องจากจะทำให้แซนแทนกัมที่ตกตะกอนได้มีขนาดเส้นใยยาว

2.7 สมบัติทางกายภาพของแซนแทนกัม

สมบัติทางกายภาพ (physical properties) เป็นสมบัติในการแสดงออกที่แตกต่างกันของสารพอลิแซ็คคาไรด์แต่ละชนิด ในการเลือกใช้สารพอลิแซ็กคาไรด์ควรพิจารณาสมบัติทางกายภาพประกอบด้วย ซึ่ง Davidson (1980)ได้เสนอสมบัติทางกายภาพของแซนแทนกัมที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (food grade) และอุตสาหกรรมทั่วไป (industrial grade) ที่มีการผลิตเป็นการค้า ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สมบัติทางกายภาพของแซนแทนกัมที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Davidson, 1980)

สมบัติ	ค่าที่ยอมรับได้	
	food grade	industrial grade
สถานะ	แห้ง	เป็นผงสีขาวครีม
ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	11	12
เถ้า (เปอร์เซ็นต์)	9	10
สี	70	70
ความถ่วงจำเพาะ	1.5	1.6
ความหนาแน่น (กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร)	836	839
อุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนสี (องศาเซลเซียส)	165	160
อุณหภูมิที่เกิดการไหม้	240	270
อุณหภูมิที่เกิดเถ้า	470	470
สารละลายแซนแทนกัม 1 เปอร์เซ็นต์		
ความร้อนของสารละลาย(แคลอรี/กรัม)	0.080	0.055
ค่าดัชนีการสะท้อนกลับ ที่ 20 องศาเซลเซียส	1.3338	1.3332
ค่าความเป็นกรดด่าง	7.0	7.0
แรงตึงผิว(dyn/cm.)	75	75
จุดเยือกแข็ง (องศาเซลเซียส)	0	0
ความหนืดเมื่อมีอิเล็กโตรไลต์		
1 เปอร์เซ็นต์(centipoise)	1400	850
ขนาดอนุภาค (Tyler standard)	80,200	40

สมบัติทางกายภาพของแซนแทนกัมที่สำคัญ ได้แก่ ความสามารถในการละลาย คุณสมบัติการไหล (rheology) และความคงตัวของความหนืดภายใต้สภาวะต่างๆ

2.7.1 ความสามารถในการละลาย

แซนแทนกัมมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น ทำให้ได้สารละลายที่มีความหนืดสูงแม้ใช้ความเข้มข้นแซนแทนกัมต่ำ ซึ่ง Kang และ Cottrel (1979) รายงานว่าแซนแทนกัมที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์สามารถให้สารละลายที่มีความหนืดประมาณ 800-1000 เซนติพอยซ์โดยการวัดด้วยเครื่อง Brookfield LVF ที่ความเร็ว 60 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้แซนแทนกัมยังสามารถละลายได้ดีทั้งในกรด ด่าง และเกลือหลายชนิด เช่น ละลายในกรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5-10 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 5-15 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งมีความสามารถในการละลายร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เช่น เมธานอล เอธานอล ไอโซโพพรานอล และแอซีโตน ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ได้โดยการเติมตัวทำละลายอย่างช้าๆ และกวนอย่างสม่ำเสมอ แต่แซนแทนกัมจะตกตะกอนทันทีถ้าตัวทำละลายมีความเข้มข้นสูงกว่านี้ (Rocks, 1971) และแซนแทนกัมนั้นยังสามารถละลายได้ดีกับสารเพิ่มความหนืดชนิดอื่นเช่นโลคัสบีนกัม(locust bean gum) คาราจีแนน (carageenan) และกัวกัม (guar gum) เป็นต้น โดยจะทำให้เกิดลักษณะเจลขึ้นเมื่อใช้ในสัดส่วนที่เหมาะสม เช่น เมื่อผสมแซนแทนกัมต่อโลคัสบีนกัม 75 : 25 ถึง 40 : 60 จะทำให้เกิดเจลที่มีความคงตัวสูง (Schuppner, 1971 อ้างถึงใน ศศิธร โชติศศิธร, 2536)

2.7.2 สมบัติทางการไหล (rheological properties)

สารละลายแซนแทนกัมมีสมบัติเด่นแตกต่างจากสารพอลิแซ็คคาไรด์ชนิดอื่น คือ เป็นของไหลประเภท non-Newtonion fluid ที่มีสมบัติเป็น pseudoplastic คือเมื่อมีแรงกระทำต่อสารละลายกัมมาก (shear rate สูง) ความหนืดของสารละลายแซนแทนกัมจะลดลง แต่เมื่อมีแรงกระทำต่อสารละลายแซนแทนกัมน้อย (shear rate ต่ำ) สารละลายจะมีแรงต้านสูงและมีความหนืดเพิ่มขึ้น (Kang and Cottrell, 1979) สมบัติการเป็น pseudoplastic ของสารละลายแซนแทนกัมช่วยป้องกันการตกตะกอนของสารขนาดใหญ่ ป้องกันการลอยตัวของหยดน้ำมัน และช่วยในการปั๊มและบรรจุอาหาร (Anonymous, 1974)

2.7.3 ความคงตัวของความหนืด

2.7.3.1 ความคงตัวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

Kovacs(1973)ได้รายงานว่าโดยทั่วไปเมื่อให้ความร้อนแก่สารละลายกัมในระยะเวลาสั้นๆ ความหนืดของสารละลายกัมจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้แตกต่างจากผลที่ได้รับจากสารละลายแซนแทนกัม โดย Betz (1979) เสนอว่าสารละลายแซนแทนกัมสามารถคงความหนืดให้คงที่ได้แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงกว้าง โดยทดลองเพิ่มอุณหภูมิให้แก่สารละลายแซนแทนกัมซึ่งมีความหนืด 1000 เซนติพอยซ์ ตั้งแต่ 0-95 องศาเซลเซียส พบว่าความหนืดของสารละลายแซนแทนกัมเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 100 เซนติพอยซ์ ซึ่งสมบัติความคงตัวของสารละลายแซนแทนกัมนี้สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในการเก็บรักษาหรือแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่ง Betz (1997) นำสารละลายแซนแทนกัมมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิของการฆ่าเชื้อโรค 121 องศาเซลเซียส นาน 15-30 นาทีในระบบปิด พบว่าความหนืดของสารละลายมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก

2.7.3.2 ความคงตัวต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง

สารละลายกัมหลายชนิดมีความหนืดเปลี่ยนแปลงเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเปลี่ยนแปลงไป และเกิดการเปลี่ยนแปลงความหนืดมากเมื่อความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมีค่าต่ำหรือมีความเป็นกรดสูง แต่ในสารละลายแซนแทนกัมจะเกิดการเปลี่ยนแปลงความหนืดน้อยมากเมื่อความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลง Kang และ Cottrell (1979) เสนอว่าสามารถใช้แซนแทนกัมเป็นสารให้ความหนืดในสารละลายที่มีกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟิวริก ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ได้โดยไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความหนืดแต่อย่างใด

2.7.3.3 ความคงตัวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือ

ในสารละลายแซนแทนกัมที่มีความเข้มข้นต่ำการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเพียงเล็กน้อยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความหนืด โดย Kovacs (1973) รายงานว่าเมื่อเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงในสารละลายแซนแทนกัมที่มีความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์จะทำให้ความหนืดของสารละลายลดลงเล็กน้อย ซึ่ง Gamini และ Mandel (1994) ได้ทำการศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของสารละลายแซนแทนกัมเมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นต่ำ โดยใช้เครื่อง static light scattering พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเกลือเท่ากับ 0.005-0.01 โมลาร์ เกลือจะไม่ส่งผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิของแซนแทนกัม แต่หากความเข้มข้นเกลือสูงกว่านี้จะทำให้โมเลกุลของแซนแทนกัมบางส่วนเกิดการจับตัวเป็นก้อน

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

กากมันสำปะหลังแห้ง จากบริษัทสำปะหลังพัฒนา จำกัด

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 อุปกรณ์

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-320 บริษัท TOMY SEICO ประเทศญี่ปุ่น

ตู้บ่ม (incubator) รุ่น Model 500 บริษัท MERCK ประเทศเยอรมนี

เครื่องเขย่า (rotary shaker) รุ่น G-50 บริษัท NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น SUPER-MIXER 1291 บริษัท LAB-LINE INSTRUMENTS ประเทศสหรัฐอเมริกา

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น DT-1 บริษัท HETO-LAB EQUIPMENT ประเทศเดนมาร์ก

เครื่องไมโครเวฟ รุ่น AH-15610A บริษัท LITTON ประเทศสหรัฐอเมริกา

มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น CG840 บริษัท SCHOTT ประเทศเยอรมนี

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB204 บริษัท METTLER TOLEDO ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

เครื่องนับจำนวนโคโลนี (colony counter) รุ่น CWN-334 บริษัท GALLENKAMP ประเทศเยอรมนี

เครื่องวัดความหนืด (viscosmeter) รุ่น LDV II+cp บริษัท BROOKFIELD ENG LABS INC. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องวัดความหนืด (viscosmeter) รุ่น RC-20 บริษัท RHEOTEC ประเทศเยอรมนี

3.2.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
กรดซิตริก	MERCK	ประเทศเยอรมนี
กรดซัลฟิวริก	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
กรดบอริก	MERCK	ประเทศเยอรมนี
กรดไดไนโตรซาลิไซลิก	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
กรดไฮโดรคลอริก	MERCK	ประเทศเยอรมนี
กลูโคส	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
ซิงค์ออกไซด์	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
ปิโตรเลียมอีเธอร์	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
วุ้นผง	เมธากรุ๊ป	ประเทศไทย
เปปโตน	LIFE TECHNOLOGIES	ประเทศสกอตแลนด์
เฟอริกคลอไรด์	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
เอธิลแอลกอฮอล์ เกรด A	อิตัลมาร์	ประเทศไทย
เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (AMG 300 L)	NOVO NORDISH	ประเทศเดนมาร์ก
เอนไซม์เซลลูเลส (CELLUCLAST 1.5 L)	NOVO NORDISH	ประเทศเดนมาร์ก
เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (BAN 480 L)	NOVO NORDISH	ประเทศเดนมาร์ก
แคลเซียมคลอไรด์	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
แคลเซียมคาร์บอเนต	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
แมกนีเซียมซัลเฟต	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
แซนแทนกัม (KELTROL®)	KELCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
แอมโมเนียมซัลเฟต	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	AJAX CHEMICALS	ประเทศออสเตรเลีย
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมนี
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมนี
โพแทสเซียมคลอไรด์	MERCK	ประเทศเยอรมนี
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	AJAX CHEMICAL	ประเทศออสเตรเลีย
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมนี

3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Xanthomonas campestris* TISTR 840 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.4 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ถ่าย *Xanthomonas campestris* TISTR 840 ลงในหลอดอาหารแข็งลาดเอียงสูตร YM (ภาคผนวก ก 1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการทดลองโดยควรถ่ายเชื้อทุกๆ 14 วัน

3.5 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

นำกากมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้น เส้นใย เถ้า และปริมาณคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ AOAC (ภาคผนวก ข) ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.6 ศึกษาวิธีการเตรียมแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อ

3.6.1 เตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

เตรียมกากมันสำปะหลังเข้มข้น 100 กรัม/ลิตรในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาทีแล้วทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมแอลฟาอะไมเลส 0.12 ยูนิต/กรัมกากมันสำปะหลังร่วมกับกลูโคอะไมเลส 9.72 ยูนิต/กรัมกากมันสำปะหลัง และเซลลูเลส 15.48 ยูนิต/กรัมกากมันสำปะหลัง (ชิดพงศ์ ประดิษฐสุวรรณ, สุมธ ตันตระเธียร และโปรดปราน สิริธีรศาสน์, 2540) และเติมแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 กรัม/ลิตร เพื่อใช้เป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ทำการกวนผสมในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสโดยใช้อัตราการกวนที่ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการต้มในน้ำเดือด 10 นาทีแล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว ทำการคั้นน้ำผ่านผ้ากรองโดยทิ้งให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นรินเฉพาะส่วนใสผ่านผ้ากรองเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Roseiro (1992) (ภาคผนวก ก 3)

3.6.2 เตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด

ทดสอบภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยกากมันสำปะหลัง โดยเตรียมกากมันสำปะหลัง 150 กรัม/ลิตรในกรดซัลฟิวริกซึ่งแปรความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 โมลาร์ ทำการย่อยโดยนึ่งในหม้อความดันไอน้ำ ซึ่งแปรอุณหภูมิเท่ากับ 100, 110 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30 และ 45 นาที จากนั้นแยกส่วนที่เป็นกากออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนใสที่ได้ตรวจปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยทำการคำนวณประสิทธิภาพการย่อยกากมันสำปะหลัง (ภาคผนวก ข) และเลือกภาวะการย่อยที่ให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเตรียมแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อ

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design ขนาด 3x3x3 จำนวน 2 ซ้ำ

3.7 ศึกษาการผลิตแซนแทนกัม

3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อ *X. campestris* TISTR 840

ถ่ายเชื้อ 1 โคโลนี จากข้อ 3.4 ลงหลอดอาหารแข็งลาดเอียงสูตร YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 1 loop ลงอาหารเหลวสูตร YM (ภาคผนวก ก 2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงโดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในขวดรูปชมพู่ซึ่งบรรจุอาหารเหลวสูตร YM เลี้ยงเชื้อโดยใช้อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตแซนแทนกัม

3.7.2 คัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัม

นำหัวเชื้อจากข้อ 3.7.1 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ถ่ายลงอาหารเหลวสูตรของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส ทำการเลี้ยงแบบเขย่า 200 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 192 ชั่วโมง

ติดตามการเจริญของเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมัก (ภาคผนวก ข 3) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณสารตะกอน (precipitate) หรือแซนแทนกัมที่ไม่บริสุทธิ์(ภาคผนวก ข 4) และดัชนีความหนืด (viscosity index : K) ของน้ำหมัก (ภาคผนวก ข 5)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design จำนวน 3 ซ้ำ

3.7.3 ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัม

ทำการผลิตแซนแทนกัมโดยเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.7.2 โดยแปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 5 3 และ 1 กรัม/ลิตร (เทียบเท่าการใช้ไนโตรเจน 37.88, 22.73 และ 7.58 มิลลิโมล/ลิตร) แปรปริมาณกรดซิตริก 6 4 และ 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 0.35 และ 0.1 กรัม/ลิตร (เทียบเท่าแมกนีเซียม 2.44 1.42 และ 0.4 มิลลิโมล/ลิตร) โดยใช้หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการเลี้ยงแบบเขย่า 200 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 144 ชั่วโมง

ติดตามการเจริญของเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมัก ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณสารตะกอน และดัชนีความหนืดของน้ำหมัก

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design ขนาด 3x3x3 จำนวน 3 ซ้ำ

3.7.4 ศึกษาวิธีการผลิตแซนแทนกัมแบบ 2 ขั้นตอน

นำอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.7.3 เลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 แบบ 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 กระตุ้นให้เชื้อเกิดการเจริญสูงด้วยการแปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1 3 5 10 และ 15 กรัม/ลิตร ใช้หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการเลี้ยงแบบเขย่า 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขั้นที่ 2 นำเชื้อที่ได้จากผลการทดลองในขั้นที่ 1 ปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งที่ความเร็วรอบ 6000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารสูตรปรับปรุงที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.7.3 ในปริมาตร 50 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเลี้ยงแบบเขย่า 200 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 144 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับการเลี้ยงเชื้อแบบขั้นตอนเดียว ซึ่งเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารสูตรปรับปรุงที่ไม่มีขั้นตอนในการกระตุ้นการเจริญ

ติดตามการเจริญของเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมัก ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณสารตะกอน และดัชนีความหนืดของน้ำหมัก

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design จำนวน 3 ซ้ำ

3.7.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการผลิตแซนแทนกัมเมื่อปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

เปรียบเทียบผลการผลิตแซนแทนกัมเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง (จากผลการทดลองข้อ 3.7.4) กับการเลี้ยงในสูตรอาหารของ Roseiro และการเลี้ยงในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็น

แหล่งคาร์บอนโดยใช้หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการเลี้ยงแบบเขย่า 200 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 144 ชั่วโมง

ติดตามการเจริญของเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมัก ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณสารตะกอน และดัชนีความหนืดของน้ำหมัก

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design จำนวน 3 ซ้ำ

3.8 ศึกษาความคงตัวของความหนืดของแซนแทนกัม

นำแซนแทนกัมที่ผลิตได้จากผลการทดลองที่ดีที่สุดจากข้อ 3.7.4 ทดสอบความสามารถในการคงตัวของความหนืดในรูปดัชนีความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืด RC-20 ในสภาวะต่างๆ เปรียบเทียบกับแซนแทนกัมที่ผลิตได้จากการเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Roseiro และแซนแทนกัม KELTROL® ซึ่งเป็นแซนแทนกัมเกรดอาหาร

3.8.1 ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

ละลายแซนแทนกัมเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ทำการแปรอุณหภูมิของสารละลายแซนแทนกัมเท่ากับ 30 50 และ 70 องศาเซลเซียส

3.8.2 ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง

ละลายแซนแทนกัมเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ทำการแปรค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายแซนแทนกัมเท่ากับ 3 5 7 9 และ 11 ทำการวัดความหนืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.8.3 ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือ

ละลายแซนทนกัมเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และแปรความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็น 0 0.1 0.3 0.5 และ 1 โมลาร์ ทำการวัดความหนืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.9 ศึกษาวิธีการตกตะกอนแซนแทนกัม

เตรียมสารละลายแซนแทนกัม KELTROL® เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำการตกตะกอนแซนแทนกัมโดยแปรอัตราส่วนปริมาตรเอธานอล (95 เปอร์เซ็นต์) ต่อปริมาตรสารละลายแซนแทนกัมเท่ากับ 1 2 และ 3 เท่า และปริมาณโพแทสเซียมคลอไรด์ 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

วิเคราะห์ผลจากปริมาณแซนแทนกัมแห้งซึ่งตกตะกอนได้ในรูปของประสิทธิภาพการตกตะกอน

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design ขนาด 3x3 จำนวน 3 ซ้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

เมื่อนำกากมันสำปะหลังที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามวิธีของ AOAC 1995. โดยสภาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังที่ใช้ในงานวิจัย

องค์ประกอบทางเคมี	เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน
โปรตีน	1.85 ± 0.29
ไขมัน	4.18 ± 0.30
ไฟเบอร์	11.58 ± 0.42
เถ้า	3.30 ± 0.04
ความชื้น	11.63 ± 0.12
คาร์โบไฮเดรต	67.46 ± 0.67

4.2 ศึกษาการเตรียมแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อ

4.2.1 เตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

เมื่อทำการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟาอะไมเลส 0.12 ยูนิต/กรัมกากมันสำปะหลังร่วมกับกลูโคอะไมเลส 9.72 ยูนิต/กรัมกากมันสำปะหลัง และเซลลูเลส 15.48 ยูนิต/กรัมกากมันสำปะหลังในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ณ. อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงพบว่าเอนไซม์ผสมทั้ง 3 ชนิดสามารถเปลี่ยนกากมันสำปะหลัง

เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 82.83 เปอร์เซ็นต์ โดยได้น้ำตาลรีดิวซ์ 0.74 กรัม/กรัมกากมันสำปะหลังในความเข้มข้น 74.24 กรัม/ลิตร

4.2.2 เตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด

เมื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยกากมันสำปะหลังโดยแปรระดับความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ อุณหภูมิ และเวลาในการย่อย ทำให้ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 6 และรูปที่ 11

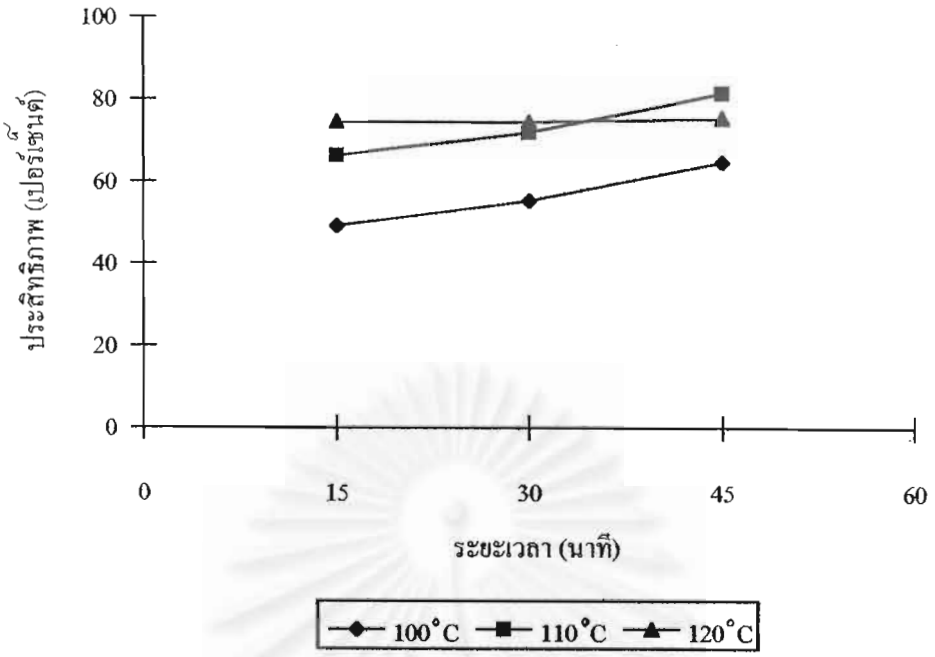
ตารางที่ 6 ผลของความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก อุณหภูมิ และเวลาการย่อย ต่อประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลัง 150 กรัมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1000 มิลลิลิตร

ความเข้มข้น (โมลาร์)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน	ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ (เปอร์เซ็นต์) ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน
0.5	100	15	66.19 ±2.93	49.22^{m} ± 2.18
		30	74.48 ± 11.28	55.40^{lo} ± 8.39
		45	86.92 ± 1.58	64.65^{hij} ± 1.17
	110	15	89.15 ± 0.90	66.31^{ghi} ±0.66
		30	96.81 ± 3.83	72.00^{cdef} ±2.85
		45	109.41 ± 6.77	81.38^{b} ± 5.03
	120	15	100.32 ± 1.13	76.12^{cde} ±0.84
		30	100.00 ± 1.36	74.38^{cde} ± 1.01
		45	101.12 ± 4.96	75.21^{cde} ± 3.70

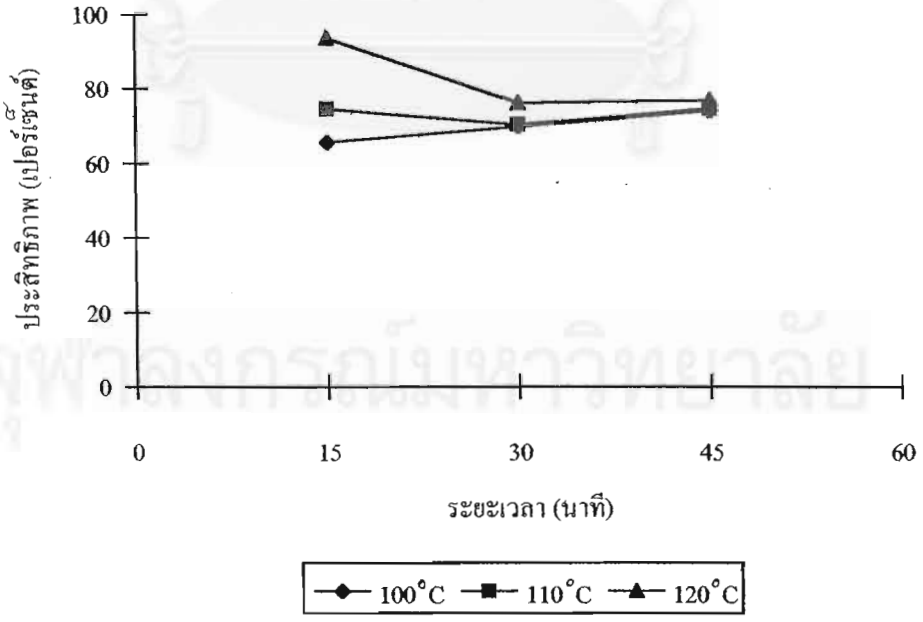
ตารางที่ 6 (ต่อ)

ความเข้มข้น (โมลาร์)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ (เปอร์เซ็นต์)
			ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน	ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน
1	100	15	88.20 ± 0.45	65.60^{hi} ± 0.34
		30	93.78 ± 1.81	69.76^{efgh} ± 1.35
		45	99.36 ± 4.51	73.90^{cdef} ± 3.36
	110	15	100.16 ± 3.83	74.50^{cde} ± 2.85
		30	94.42 ± 1.13	70.22^{defgh} ± 0.84
		45	100.00 ± 1.13	74.38^{cde} ± 0.84
	120	15	125.84 ± 1.12	93.50^{a} ± 0.84
		30	102.23 ± 0.90	76.04^{bcd} ± 0.67
		45	103.35 ± 1.13	76.88^{bc} ± 0.84
2	100	15	91.71 ± 2.03	68.21^{fgh} ± 1.51
		30	93.97 ± 2.03	69.89^{efgh} ± 1.51
		45	101.91 ± 0.23	75.80^{bcde} ± 0.17
	110	15	98.24 ± 2.93	73.08^{cdef} ± 2.18
		30	79.11 ± 1.80	58.84^{jk} ± 1.34
		45	80.22 ± 1.80	59.67^{jk} ± 1.34
	120	15	98.56 ± 0.23	73.31^{cdef} ± 0.17
		30	79.90 ± 4.29	59.43^{jk} ± 3.18
		45	83.25 ± 3.16	61.92^{ij} ± 2.36

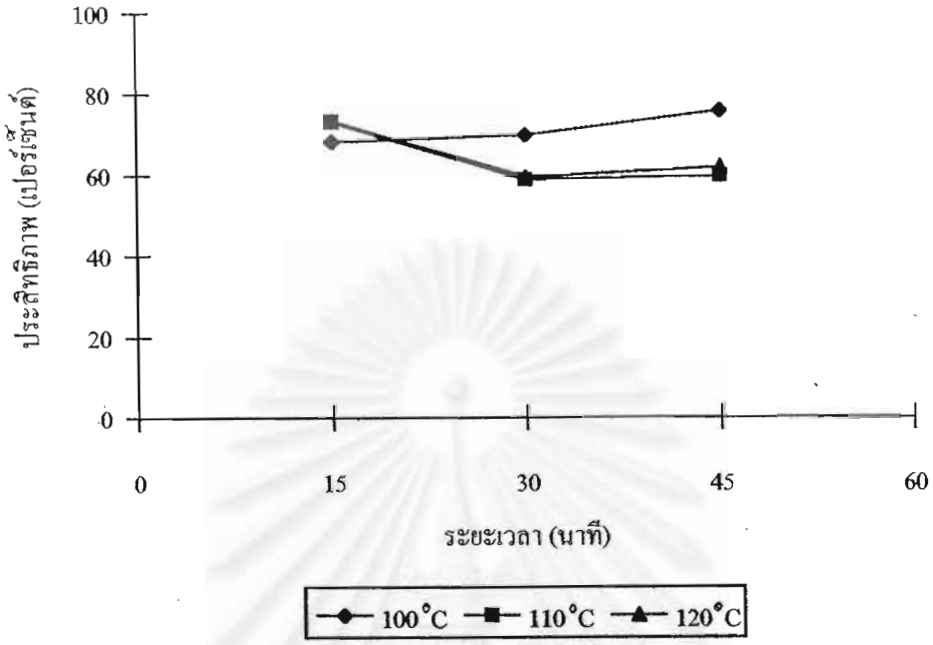
a,b,...ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)



รูปที่11ก **ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อใช้กรด**ซัลฟิวริกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ย่อยกาก มันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 100 110 และ120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 30 และ45 นาที



รูปที่11ข **ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อใช้กรด**ซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์ย่อยกาก มันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 100 110 และ120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 30 และ45 นาที



รูปที่11ค ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 โมลาร์ ย่อยกากมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 100 110 และ120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 30 และ45 นาที

เมื่อทำการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พบว่าการเพิ่มเวลาการย่อยร่วมกับการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 และ 110 องศาเซลเซียสทำให้ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ดีขึ้น แต่หากใช้ความร้อนในการย่อยสูงถึง 120 องศเซลเซียสการเพิ่มเวลากลับไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพแต่อย่างใด ขณะที่การเพิ่มเวลาในการย่อยเมื่อใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อทำการย่อยโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส โดยทำให้ประสิทธิภาพลดลงจาก 93.50 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำการย่อยนาน 15 นาทีเหลือ 76.04 และ 76.88 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำการย่อยนาน 30 และ 45 นาทีตามลำดับ ซึ่งเมื่อลดอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยลงเหลือ 110 องศาเซลเซียสการเพิ่มเวลาการย่อยไม่ทำให้ประสิทธิภาพเปลี่ยนแปลง และเมื่อใช้อุณหภูมิในการย่อยเท่ากับ 100 องศาเซลเซียสพบว่าประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาการย่อยจาก 15 เป็น 45 นาที ส่วนการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 โมลาร์นั้น พบว่าการเพิ่มเวลาร่วมกับ

กับการใช้อุณหภูมิในการย่อยสูงคือ 120 และ 110 องศาเซลเซียสทำให้ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง แต่เมื่อลดอุณหภูมิในการย่อยเหลือ 100 องศาเซลเซียสจะทำให้ประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการย่อยจาก 15 เป็น 45 นาที

การใช้อุณหภูมิในการย่อยกากมันสำปะหลังสูงสุดคือ 120 องศาเซลเซียสให้ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเมื่อทำการย่อยโดยใช้เวลาในการย่อยนาน 15 นาทีที่ทุกระดับความเข้มข้นของกรดที่ใช้ ซึ่งหากเพิ่มเวลาการย่อยมากขึ้นการใช้อุณหภูมิการย่อย 120 องศาเซลเซียสจะให้ประสิทธิภาพเท่ากับ หรือน้อยกว่าการใช้อุณหภูมิการย่อย 110 องศาเซลเซียส และทำให้ประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเมื่อทำการย่อยร่วมกับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 โมลาร์

การเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการย่อยจาก 0.5 โมลาร์เป็น 1 โมลาร์ ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังสูงขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิในการย่อยเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส ส่วนการใช้อุณหภูมิเท่ากับ 110 และ 120 องศาเซลเซียสจะทำให้ประสิทธิภาพดีขึ้นเมื่อใช้เวลาในการย่อยสั้นที่สุดคือ 15 นาทีเท่านั้น ขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นกรดจาก 1 โมลาร์ เป็น 2 โมลาร์ไม่ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นแต่กลับทำให้ประสิทธิภาพเท่าเดิมหรือลดลงเมื่อใช้อุณหภูมิในการย่อยเท่ากับ 110 องศาเซลเซียสทำการย่อยนาน 30 และ 45 นาทีและเมื่อใช้อุณหภูมิการย่อย 120 องศาเซลเซียส โดยให้ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองนี้พบว่าภาวะที่ให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ดีที่สุด คือ การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 0.84 กรัม/กรัมกากมันสำปะหลังและให้น้ำตาลรีดิวซ์ในความเข้มข้น 125.84 กรัม/ลิตร โดยให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 93.60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ความแตกต่างทางสถิติกับภาวะการย่อยอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงใช้ภาวะการย่อยกากมันสำปะหลังนี้ในการเตรียมแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ผลิตแซนแทนกัมในขั้นตอนต่อไป

4.3 ศึกษาการผลิตแซนแทนกัม

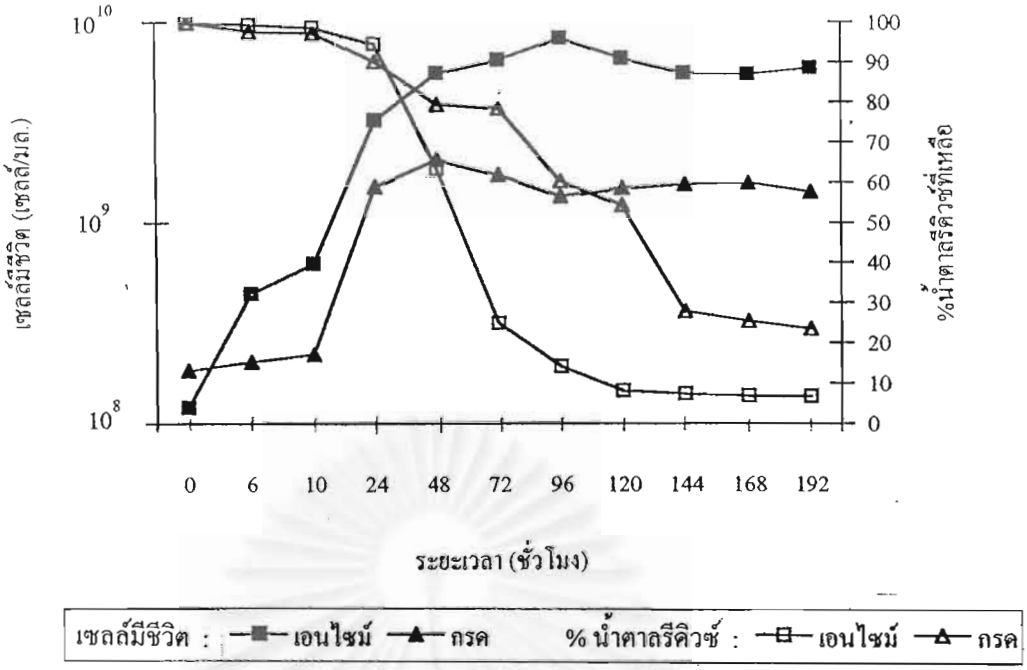
4.3.1 คัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัม

เมื่อทำการเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Roseiro โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และกรดเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้น้ำตาลกลูโคส ใช้หัวเชื้อตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการเลี้ยงแบบ

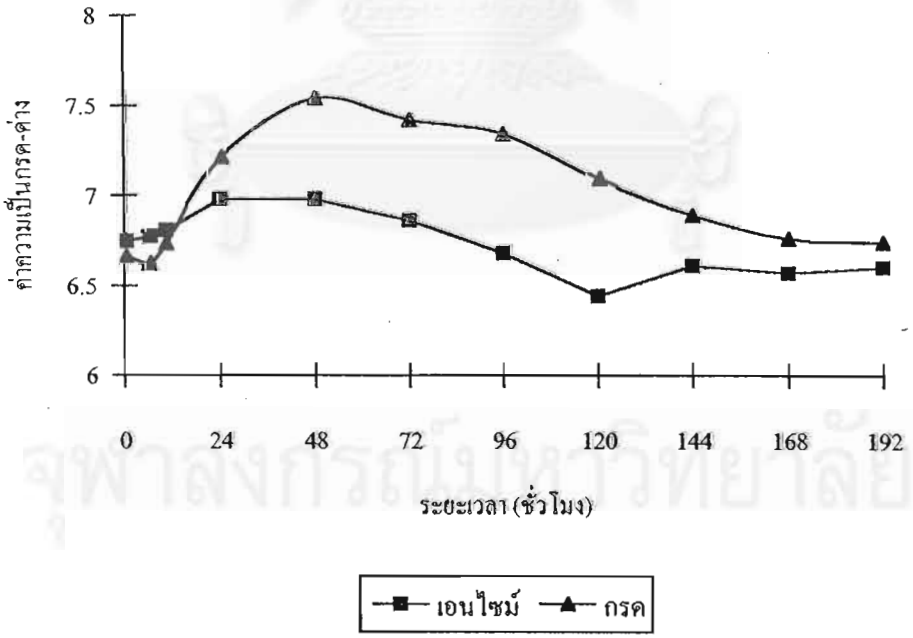
เขย่า 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วติดตามการเจริญของเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณสารตะกอน และค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมัก พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนให้การเจริญของเชื้อดีกว่าการเลี้ยงโดยใช้สารละลายกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 12 ก) โดยมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในน้ำหมักประมาณ 6 $x10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร ขณะที่เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตประมาณ 1.50 $x10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร ส่วนการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักนั้น (รูปที่ 12 ก) พบว่าการเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์มีการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า โดยเฉพาะในชั่วโมงที่ 24-72 ของการผลิตมีน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อสิ้นสุดการผลิตเหลือน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักเพียง 6.72 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การเลี้ยงเชื้อโดยการใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดมีการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ค่อนข้างคงที่ โดยเมื่อสิ้นสุดการผลิตเหลือน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 23.58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดนี้ให้การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักค่อนข้างคงที่อยู่ในช่วง 6.5-7.5 (รูปที่ 12 ข)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารตะกอนในการใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 12 ค) คือ ปริมาณสารตะกอนลดลงในช่วงแรกจากนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นและลดลงอีกจนถึงจุดต่ำสุดที่ 120 ชั่วโมงการผลิตเมื่อใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ 96 ชั่วโมงการผลิตเมื่อใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ โดยเมื่อสิ้นสุดการผลิตพบว่ามีปริมาณสารตะกอนในน้ำหมัก 45.46 และ 18.56 กรัม/ลิตรเมื่อใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ ซึ่งการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์สามารถให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักสูงกว่าชัดเจน (รูปที่ 12 ค) โดยสามารถให้ค่าดัชนีความหนืดได้ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของผลิตและให้ค่าสูงสุดเมื่อทำการผลิตได้ 144 ชั่วโมงเท่ากับ 10.07 $Pa\ s^{0.74}$

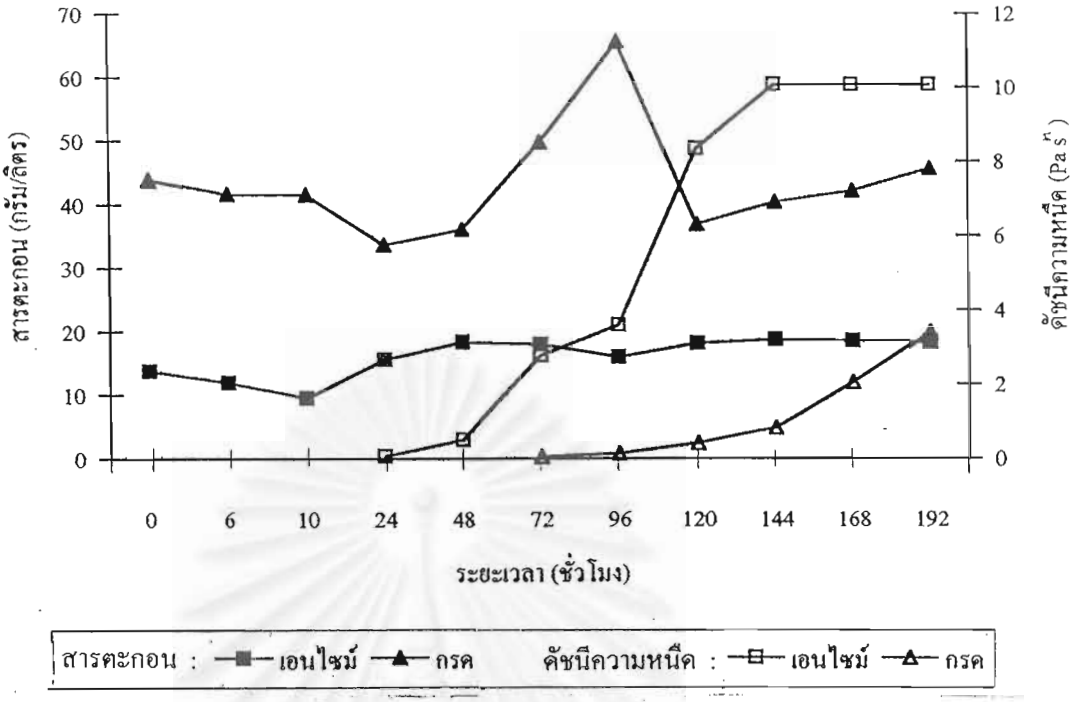
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเตรียมแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อโดยการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมสูงกว่าการเตรียมแหล่งคาร์บอนด้วยการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงทำการเตรียมแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยงเชื้อโดยการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์



รูปที่ 12 ก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และกรดเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 12 ข การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และกรดเป็นแหล่งคาร์บอน



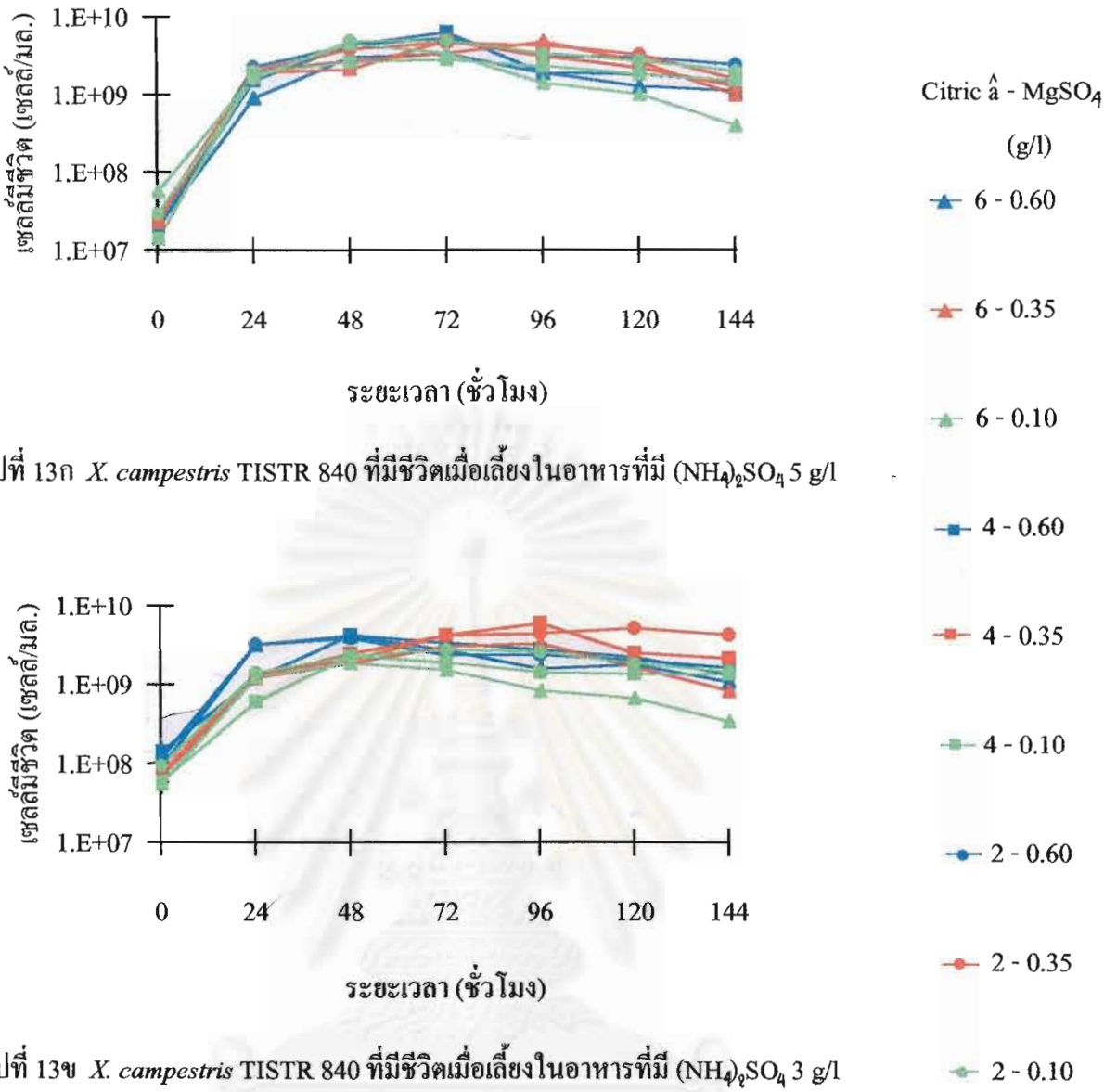
รูปที่ 12 ค ปริมาณสารตะกอนและค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และกรดเป็นแหล่งคาร์บอน

4.3.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแซนแทนกัม

เมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในสูตรอาหารของ Roseiro โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้หัวเชื้อตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการเลี้ยงแบบเขย่า 200 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิห้อง โดยแปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 6 3 และ 1 กรัม/ลิตร กรดซิตริกเท่ากับ 6 4 และ 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.60 0.35 และ 0.10 กรัม/ลิตรในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วติดตามการเจริญของเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณสารตะกอน และค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมัก พบว่าการเจริญของ *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตรการแปรสารอาหารมีลักษณะคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 13 ก 13 ข และ 13 ค) โดยเชื้อเริ่มมีการเจริญคงที่ที่ 24-48 ชั่วโมงของการผลิต ให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร โดยเชื้อที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม/ลิตร (รูปที่ 14 ก) มีความสามารถในการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้เกือบหมดเมื่อมีกรดซิตริกในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณต่ำสุดคือ 2 กรัม/ลิตร ซึ่งทำให้มีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ

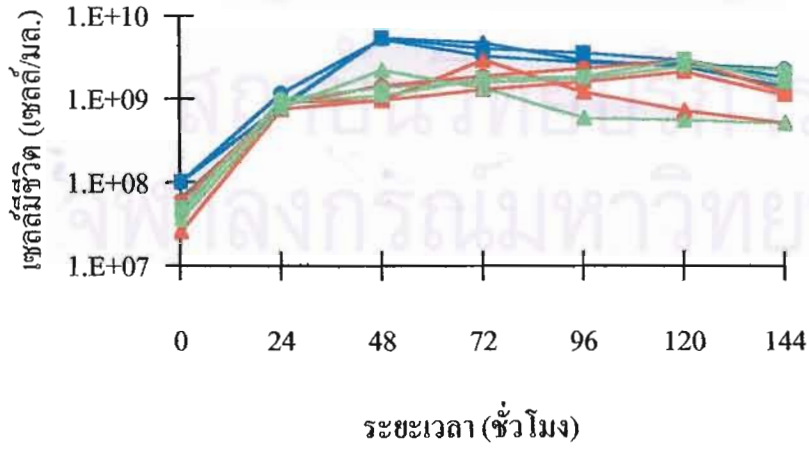
อยู่ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการผลิตที่ 144 ชั่วโมงเท่ากับ 6-10 เปอร์เซ็นต์และหากเพิ่มปริมาณของกรดซิตริกที่ใช้เป็น 4 หรือ 6 กรัม/มิลลิลิตรจะทำให้น้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในน้ำหมักสูงถึง 30-40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการลดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในสูตรอาหารลงเหลือ 3 กรัม/ลิตร (รูปที่ 14 ข) และ 1 กรัม/ลิตร (รูปที่ 14 ค) จะทำให้การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อสูงขึ้น โดยเฉพาะเมื่อลดปริมาณกรดซิตริกเหลือ 2 กรัม/ลิตรทำให้เชื้อสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้เกือบหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ของการผลิต และเหลือน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก 8 เปอร์เซ็นต์เมื่อสิ้นสุดการผลิต ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักนั้นพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 6.5-8.0 โดยเมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตในสูตรอาหารต่ำลงจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลง โดยเฉพาะเมื่อลดแมกนีเซียมซัลเฟตเหลือ 0.10 กรัม/ลิตรทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักมีค่าต่ำที่สุด (รูปที่ 15 ก 15 ข และ 15 ค)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารตะกอนของทุกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 16 ก, 16 ข และ 16 ค) มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือปริมาณสารตะกอนในน้ำหมักเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการผลิต แต่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 72-120 ปริมาณสารตะกอนลดลงชัดเจนจากนั้นเพิ่มปริมาณขึ้นอีก ซึ่งเมื่อสิ้นสุดการผลิตได้ปริมาณสารตะกอน 15-20 กรัม/ลิตร โดยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม/ลิตร กรดซิตริก 6 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.35 กรัม/ลิตรให้ปริมาณสารตะกอนมากที่สุดเท่ากับ 20.65 กรัม/ลิตร และน้ำหมักจากทุกสูตรอาหารสามารถให้ค่าดัชนีความหนืดได้ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการผลิต โดยส่วนใหญ่ค่าดัชนีความหนืดมีการเพิ่มขึ้นชัดเจนเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 120 ชั่วโมง (รูปที่ 17 ก 17 ข และ 17 ค) ซึ่งการลดปริมาณแอมโมเนียม-ซัลเฟตในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อลงนั้นช่วยทำให้น้ำหมักมีค่าดัชนีความหนืดสูงขึ้น ยกเว้นเมื่อลดแอมโมเนียมซัลเฟตเหลือ 1 กรัม/ลิตรร่วมกับแมกนีเซียมซัลเฟต 0.60 กรัม/ลิตรที่ทุกระดับการใช้กรดซิตริก และส่วนใหญ่การลดปริมาณกรดซิตริกหรือการลดปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตจะทำให้น้ำหมักมีค่าดัชนีความหนืดสูงขึ้น ยกเว้นการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่ลดปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเหลือ 0.10 กรัม/ลิตรร่วมกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม/ลิตร และกรดซิตริก 6 กรัม/ลิตร และในสูตรอาหารซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัม/ลิตร และกรดซิตริก 6 กรัม/ลิตร ซึ่งเมื่อนำค่าดัชนีความหนืดทดสอบความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 7) พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร กรดซิตริก 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.10 กรัม/ลิตร เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักสูงที่สุดเท่ากับ 16.99 $Pa\ s^{0.69}$ โดยให้ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์และให้ผลผลิต (yield) เท่ากับ 0.60 กรัม/กรัมน้ำตาล

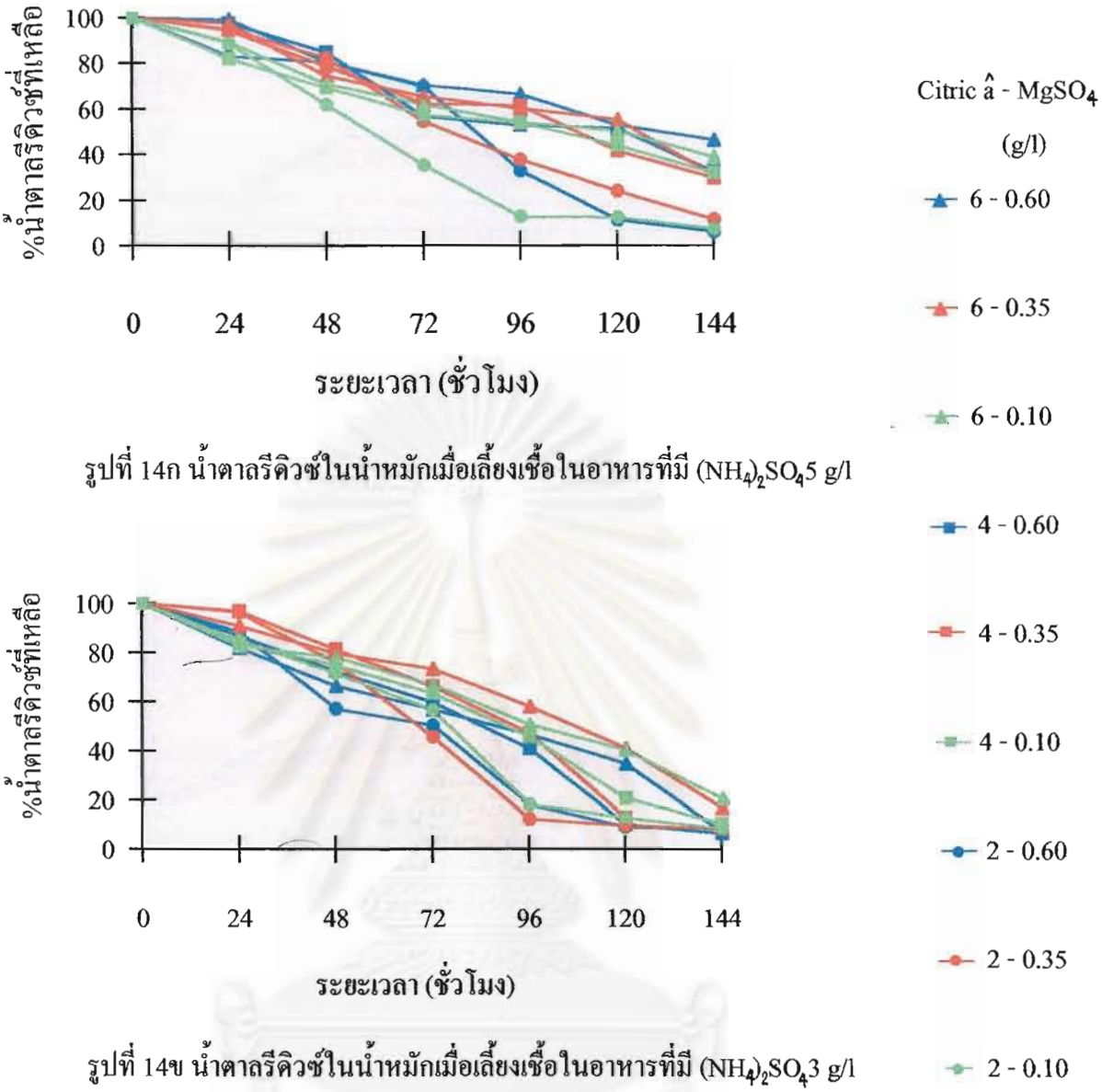


รูปที่ 13ก *X. campestris* TISTR 840 ที่มีชีวิตเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 5 g/l

รูปที่ 13ข *X. campestris* TISTR 840 ที่มีชีวิตเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 3 g/l

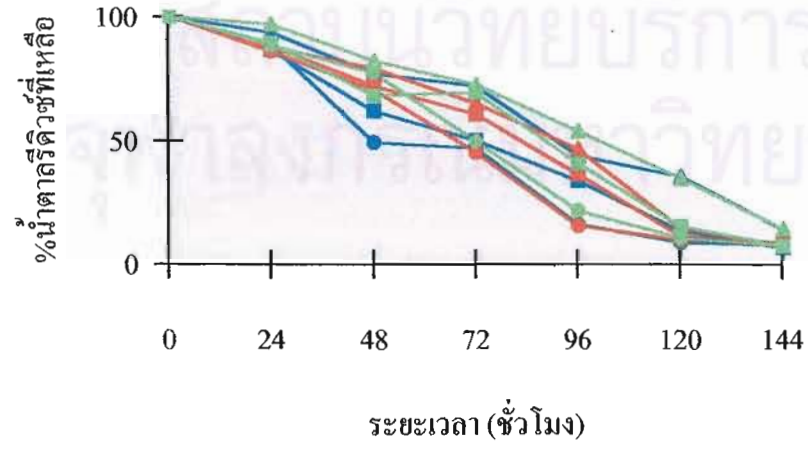


รูปที่ 13ค *X. campestris* TISTR 840 ที่มีชีวิตเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/l

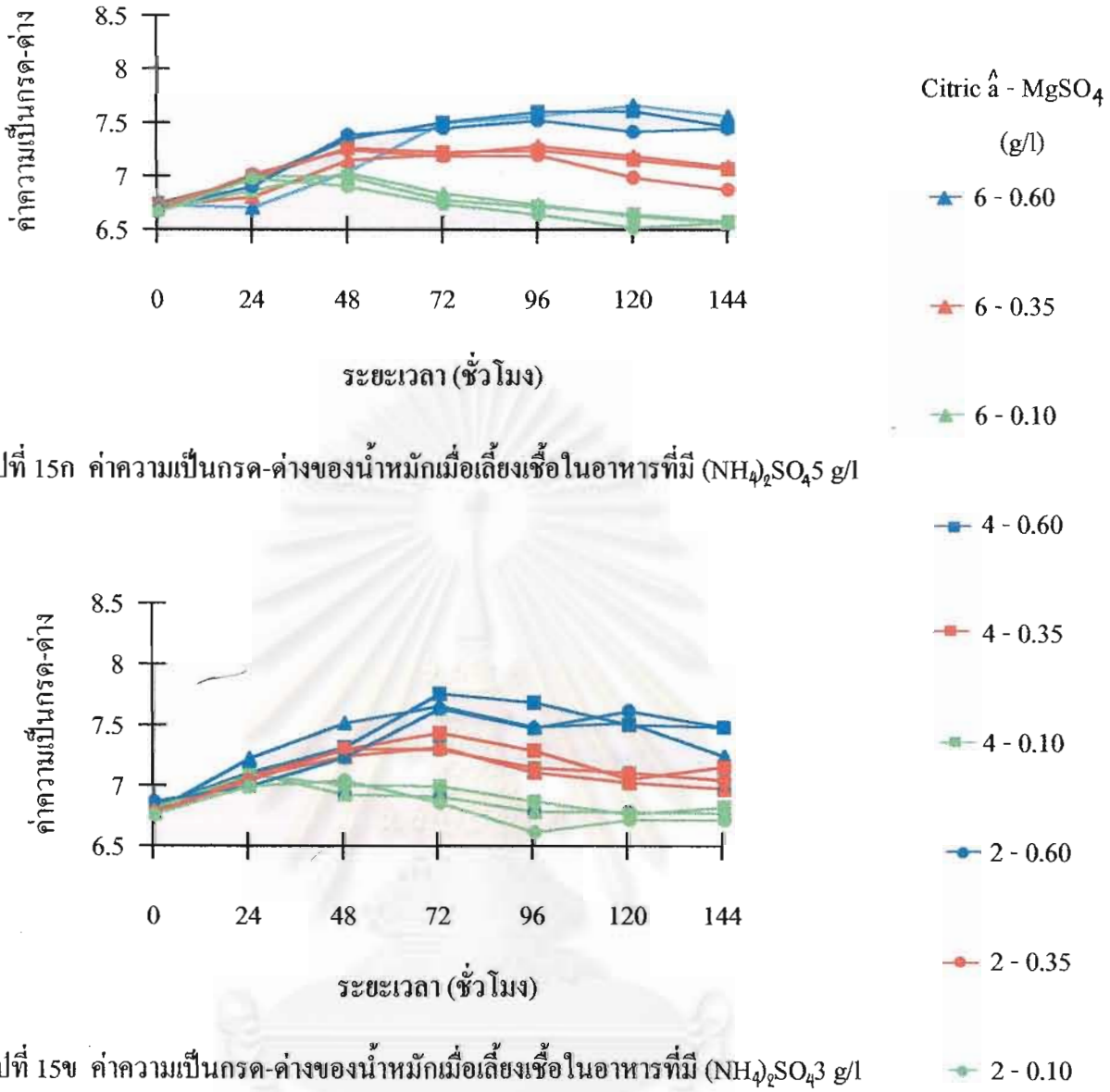


รูปที่ 14ก น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 5 g/l

รูปที่ 14ข น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 3 g/l

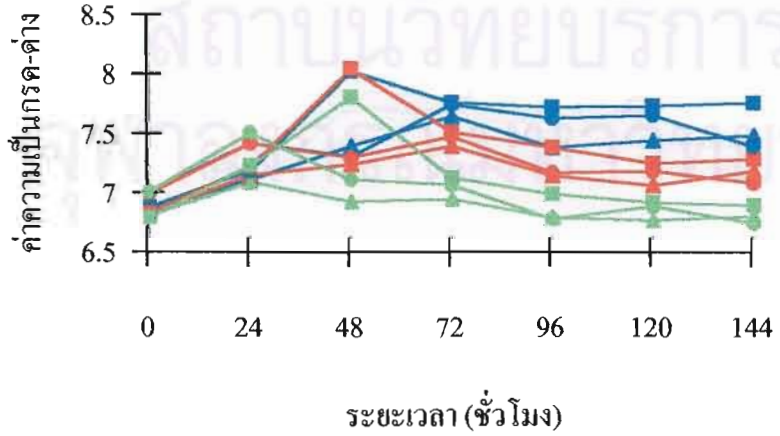


รูปที่ 14ค น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/l

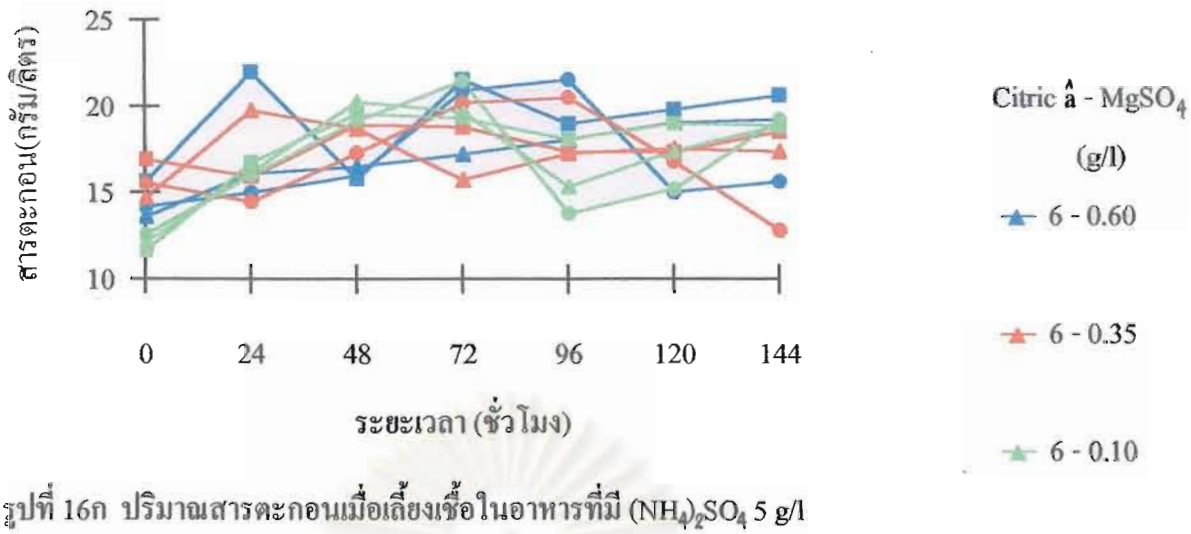


รูปที่ 15ก ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 5 g/l

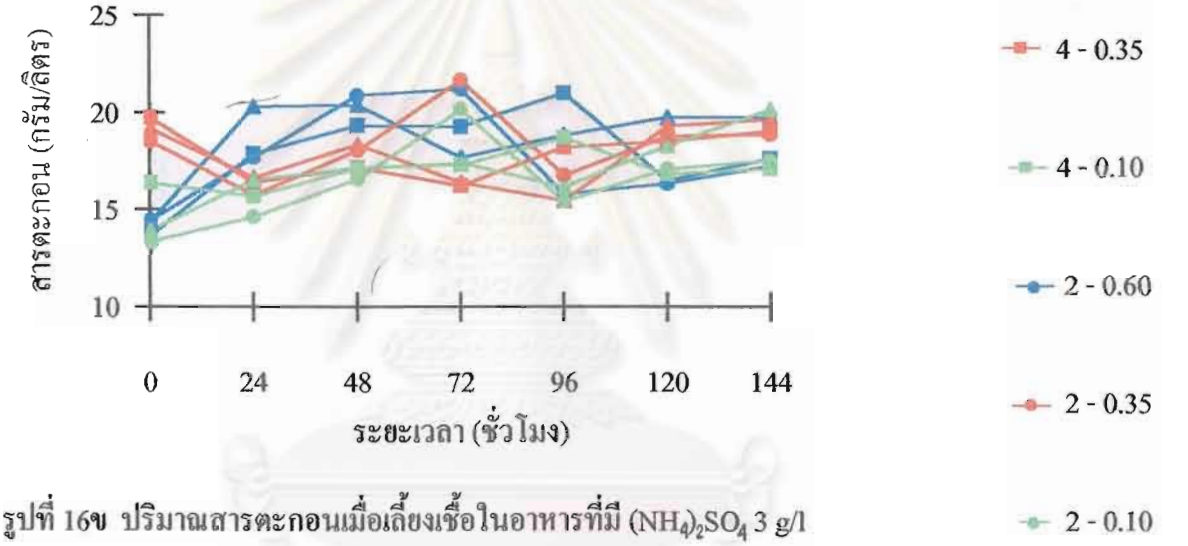
รูปที่ 15ข ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 3 g/l



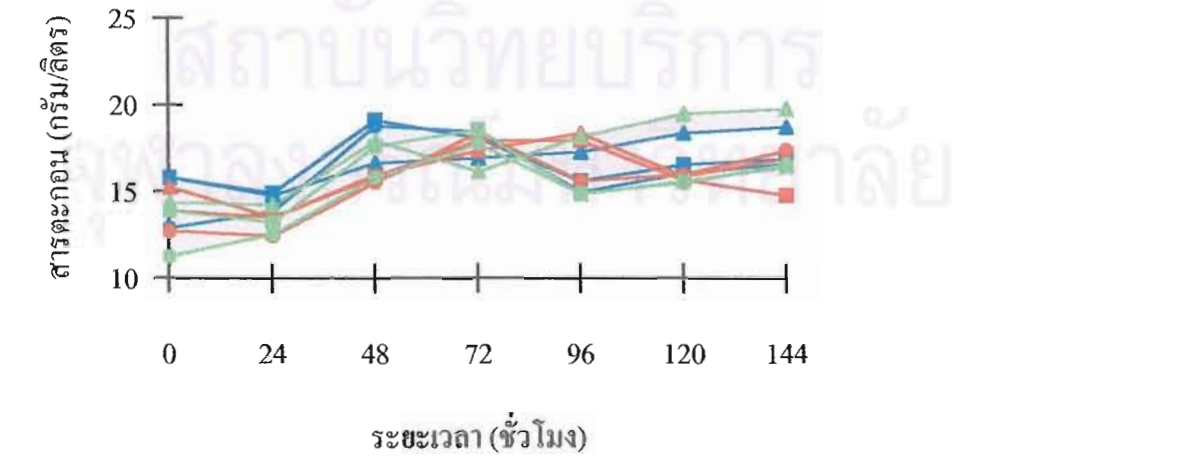
รูปที่ 15ค ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/l



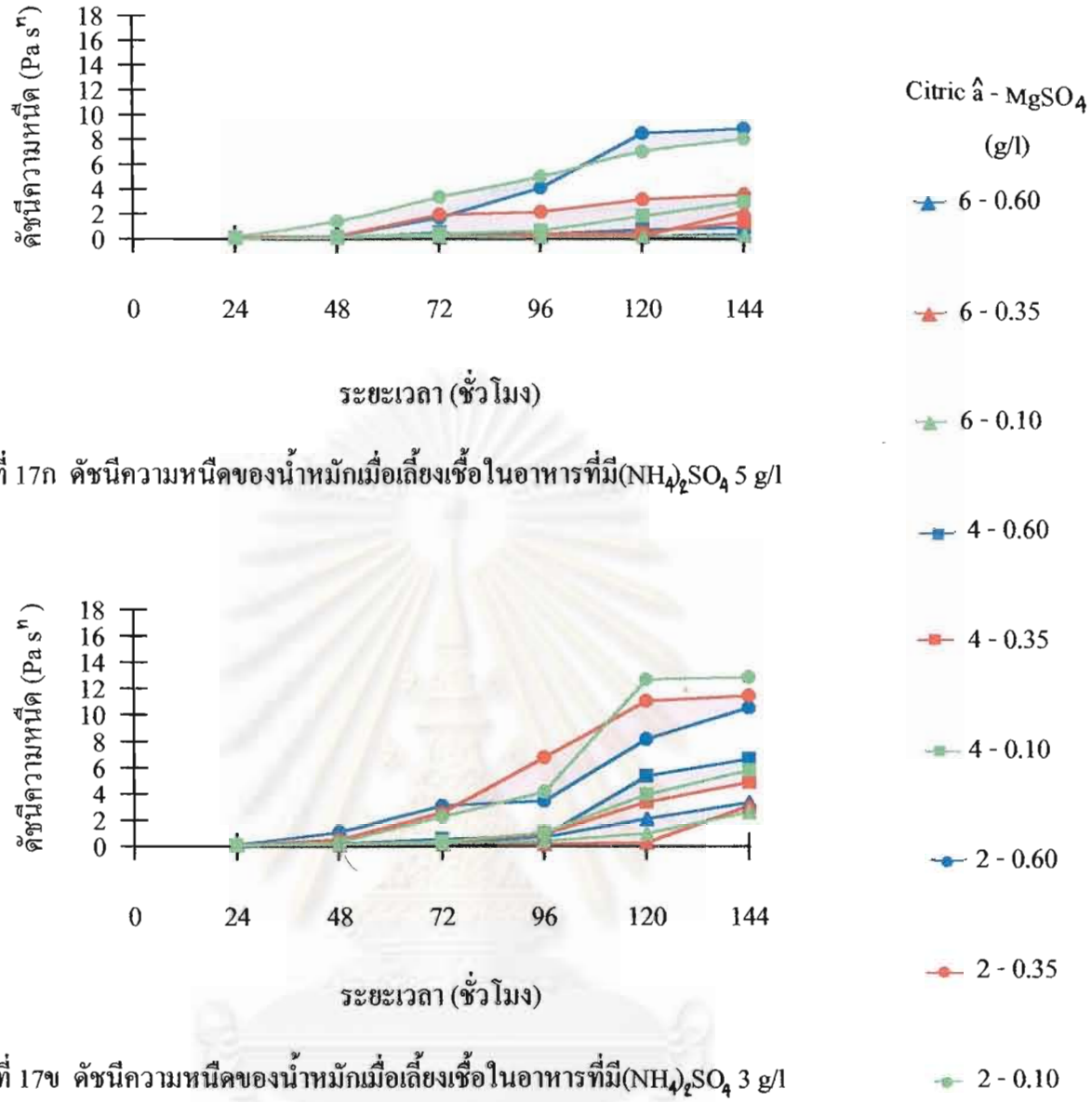
รูปที่ 16ก ปริมาณสารตะกอนเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 5 g/l



รูปที่ 16ข ปริมาณสารตะกอนเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 3 g/l

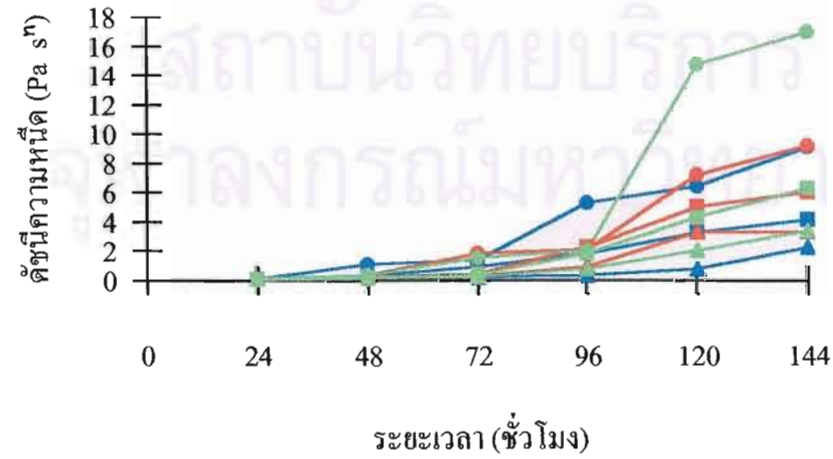


รูปที่ 16ค ปริมาณสารตะกอนเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/l



รูปที่ 17ก ดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี$(NH_4)_2SO_4$ 5 g/l

รูปที่ 17ข ดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี$(NH_4)_2SO_4$ 3 g/l



รูปที่ 17ค ดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี$(NH_4)_2SO_4$ 1 g/l

ตารางที่ 7 ดัชนีความหนืดของน้ำหมักที่ 144 ชั่วโมงของการผลิตแซนแทนกัมเมื่อเลี้ยง *X. campestrisn* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแปรปริมาณสารอาหาร

สูตรอาหาร (กรัม/ลิตร)			ดัชนีความหนืด ($Pa\ s^n$)	n
แอมโมเนียมซัลเฟต	กรดซิตริก-แมกนีเซียมซัลเฟต		ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน	
5	6	0.60	$0.42^{o} \pm 0.03$	0.82
		0.35	$2.30^{m} \pm 0.07$	0.66
		0.10	$0.32^{o} \pm 0.02$	0.83
	4	0.60	$1.02^{n} \pm 0.11$	0.84
		0.35	$1.42^{n} \pm 0.03$	0.70
		0.10	$3.06^{kl} \pm 0.06$	0.33
	2	0.60	$3.65^{jk} \pm 0.21$	0.69
		0.35	$8.12^{f} \pm 0.57$	0.76
		0.10	$8.91^{e} \pm 0.19$	0.76
3	6	0.60	$3.37^{k} \pm 0.15$	0.71
		0.35	$3.08^{kl} \pm 0.08$	0.67
		0.10	$2.60^{lm} \pm 0.62$	0.72
	4	0.60	$4.89^{i} \pm 0.13$	0.68
		0.35	$5.80^{h} \pm 0.19$	0.76
		0.10	$6.67^{g} \pm 0.14$	0.71
	2	0.60	$10.58^{d} \pm 1.08$	0.71
		0.35	$11.46^{c} \pm 0.14$	0.70
		0.10	$12.88^{b} \pm 0.24$	0.66

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 (ต่อ)

สูตรอาหาร (กรัม/ลิตร)			ดัชนีความหนืด ($Pa\ s^n$)	n
แอมโมเนียมซัลเฟต	กรดซิตริก	แมกนีเซียมซัลเฟต	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน	
1	6	0.60	$2.28^{m} \pm 0.40$	0.70
		0.35	$3.39^{k} \pm 0.03$	0.71
		0.10	$3.42^{k} \pm 0.35$	0.72
	4	0.60	$4.17^{j} \pm 0.27$	0.70
		0.35	$6.04^{h} \pm 0.09$	0.71
		0.10	$6.32^{gh} \pm 0.15$	0.71
	2	0.60	$9.15^{e} \pm 0.13$	0.72
		0.35	$9.20^{e} \pm 0.07$	0.72
		0.10	$16.99^{a} \pm 0.35$	0.69

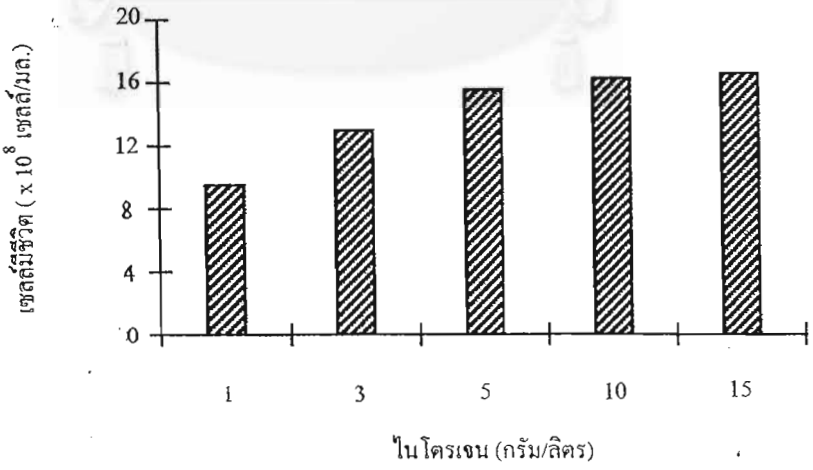
a,b,...ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

4.3.3 ศึกษาวิธีการผลิตแซนแทนกัมแบบ 2 ขั้นตอน

เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร กรดซิตริก 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.10 กรัม/ลิตรเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 เพื่อผลิตแซนแทนกัมแบบ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นที่ 1 กระตุ้นให้เชื้อเกิดการเจริญสูงใน 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงด้วยการเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขั้นที่ 2 ถ่ายเชื้อจากขั้นตอนแรกลงในอาหารสูตรปรับปรุงซึ่งใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนโดยทำการแปรปริมาตรเชื้อที่ถ่ายลงอาหารแตกต่างกัน และทำการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับการเลี้ยงเชื้อแบบขั้นตอนเดียวซึ่งใช้อาหารสูตรปรับปรุงในการเลี้ยงแต่ไม่มีขั้นตอนในการกระตุ้นให้เชื้อเกิดการเจริญซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในข้อ 4.3.3.1 และ 4.3.3.2

4.3.3.1 ศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

เมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยกรดซิตริก 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.10 กรัม/ลิตร โดยแปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1 3 5 10 และ 15 กรัม/ลิตร ใช้หัวเชื้อตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรทำการเลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสูตรอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5 10 และ 15 กรัม/ลิตรเป็นกลุ่มที่ให้การเพิ่มขึ้นของเชื้อสูงสุด (รูปที่ 18)โดยให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้น 1.56 $x10^9$ 1.63 $x10^9$ และ 1.66 $x10^9$ เซลล์/มิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มจำนวนเซลล์จากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตทั้ง 3 ระดับนี้ไม่ให้ความแตกต่างทางสถิติต่อกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8) ส่วนการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัม/ลิตรให้การเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 1.30 $x10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร ขณะที่การใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตรให้การเพิ่มจำนวนเซลล์ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.95 $x10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร ดังนั้นจึงใช้สูตรอาหารซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม/ลิตรในการเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นการเจริญเนื่องจากเป็นสูตรอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตน้อยที่สุดในกลุ่มที่ให้การเจริญสูงสุด



รูปที่ 18 จำนวนเซลล์มีชีวิตที่เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1 3 5 10 และ 15 กรัม/ลิตร

ตารางที่ 8 จำนวนเซลล์มีชีวิตที่เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

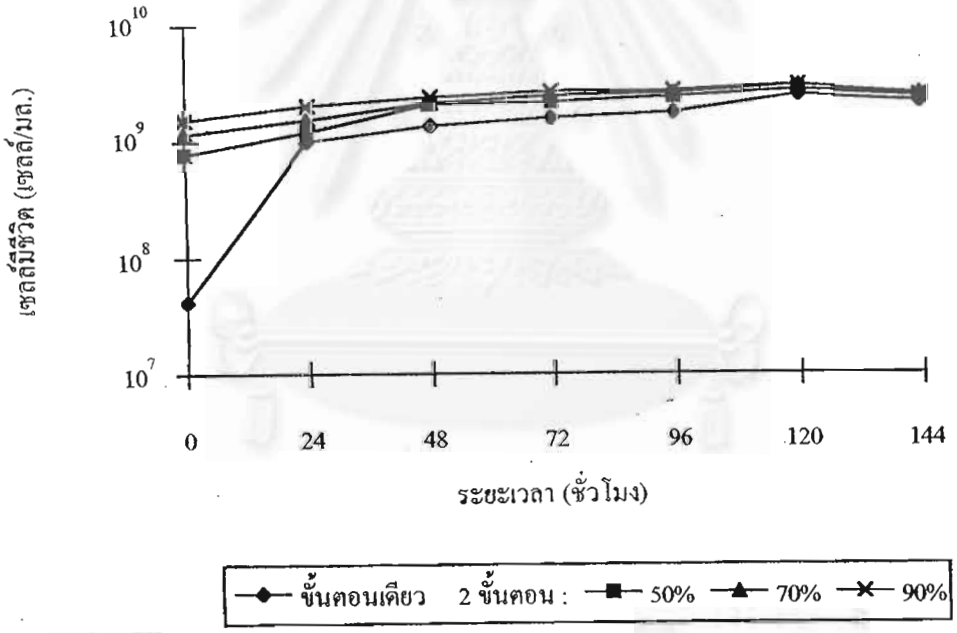
แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	จำนวนเซลล์มีชีวิตที่เพิ่มขึ้น (x 10^9 เซลล์ / มิลลิลิตร) ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน
1	$0.95^{c} \pm 6.40 \times 10^{7}$
3	$1.30^{b} \pm 9.20 \times 10^{7}$
5	$1.56^{a} \pm 3.50 \times 10^{7}$
10	$1.63^{a} \pm 4.80 \times 10^{7}$
15	$1.66^{a} \pm 3.80 \times 10^{7}$

a,b... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

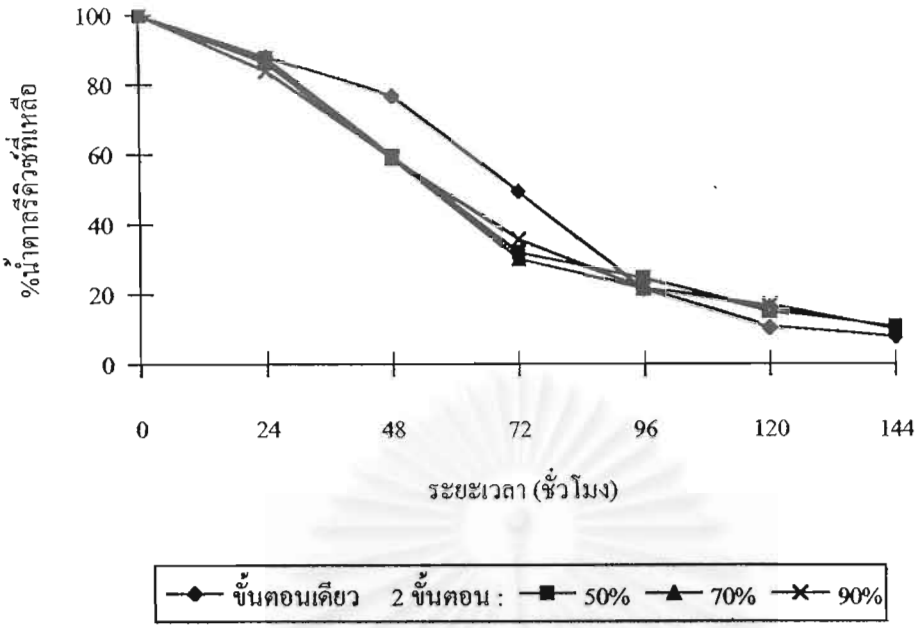
4.3.3.2 ศึกษาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัม

เมื่อนำ *X. campestris* TISTR 840 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม/ลิตรถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงซึ่งประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร กรดซิตริก 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.10 กรัม/ลิตร โดยแปรปริมาตรของเชื้อที่ถ่ายเท่ากับ 50 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ทำการเลี้ยงแบบเขย่า 200 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิห้อง เปรียบเทียบกับการผลิตแบบขั้นเดียวซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงสูตรปรับปรุงที่ไม่มีขั้นตอนการกระตุ้นให้เชื้อเกิดการเจริญ (ข้อ 4.3.2) พบว่าการถ่ายเชื้อปริมาตร 90 เปอร์เซ็นต์ให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นเมื่อเข้าสู่การผลิตในขั้นที่ 2 มากที่สุด คือ 1.54 x10^9 เซลล์/มิลลิลิตร รองมาคือการใช้เชื้อ 70 และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นมากกว่าการผลิตแบบขั้นตอนเดียว (รูปที่ 19 ก) แต่เมื่อเชื้อเจริญพ้น 24 ชั่วโมงแรกแล้วจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ได้จากการผลิตทั้ง 2 แบบมีปริมาณใกล้เคียงกัน โดยเมื่อสิ้นสุดการผลิตมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต 2.00-2.50 x10^9 เซลล์/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณสารตะกอน และค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมัก ซึ่งพบว่าการผลิตแซนแทนกัมทั้ง 2 แบบให้ผลการทดลองคล้ายคลึงกัน แตกต่างกันเพียงการผลิตแบบ 2 ขั้นตอนให้ผลการทดลองเร็วกว่า

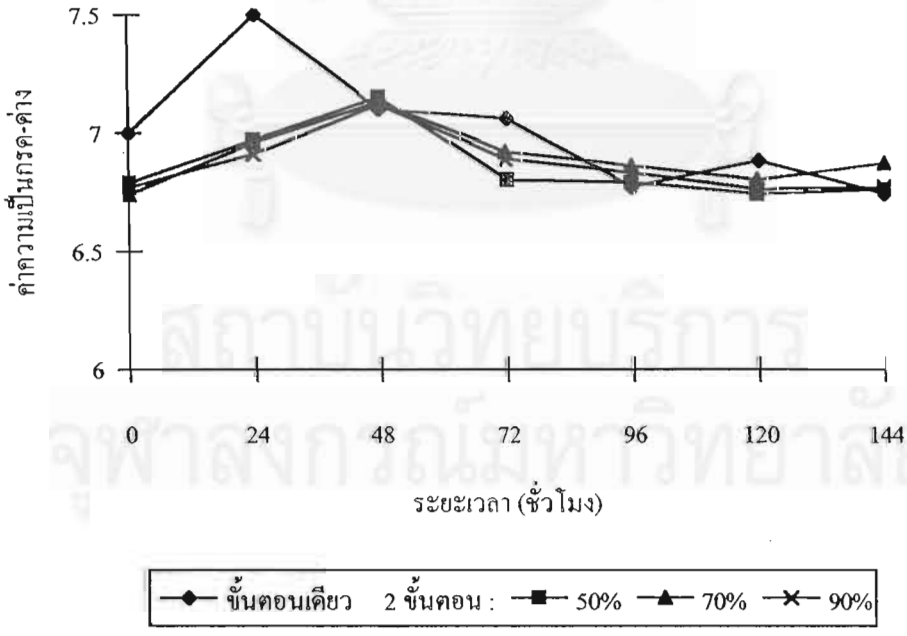
แบบขั้นตอนเดียว 24 ชั่วโมง โดยการผลิตแบบ 2 ขั้นตอนเชื้อมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์มากในช่วง 24-72 ชั่วโมง ขณะที่การผลิตแบบขั้นเดียวเชื้อมีการใช้น้ำตาลมากในชั่วโมงที่ 48-96 ซึ่งเมื่อสิ้นสุดการผลิตทั้ง 2 แบบมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในน้ำหมักใกล้เคียงกัน คือ เหลือน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 19 ข) และความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเมื่อพ้น 24 ชั่วโมงแรกของการผลิตทั้ง 2 แบบมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 7.0 (รูปที่ 19 ค) สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารตะกอนนั้นจะมีการเพิ่มขึ้นในช่วงแรก จากนั้นจะลดปริมาณลง และเพิ่มขึ้นอีกที่ 96 ชั่วโมงของการผลิตแบบ 2 ขั้นตอนและชั่วโมงที่ 120 ในการผลิตแบบขั้นเดียว (รูปที่ 19 ง) ซึ่ง ณ ชั่วโมงที่ปริมาณสารตะกอนเพิ่มขึ้นนั้นให้การเพิ่มค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักชัดเจน (รูปที่ 19 จ) และเมื่อสิ้นสุดการผลิตพบว่าการผลิตแซนแทนกัมทั้ง 2 แบบให้ค่าดัชนีความหนืดใกล้เคียงกันคือให้ค่าเท่ากับประมาณ 17 Pa s^n (รูปที่ 19 จ)



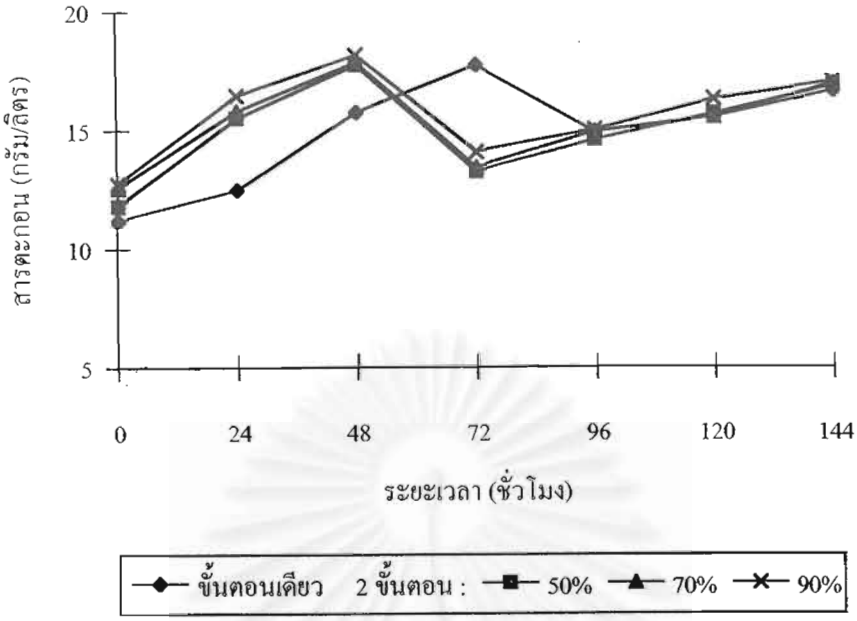
รูปที่ 19ก จำนวนเซลล์ *X. campestris* TISTR 840 ที่มีชีวิตในการเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียวและ 2 ขั้นตอนซึ่งแปรปริมาณเชื้อเท่ากับ 50. 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์



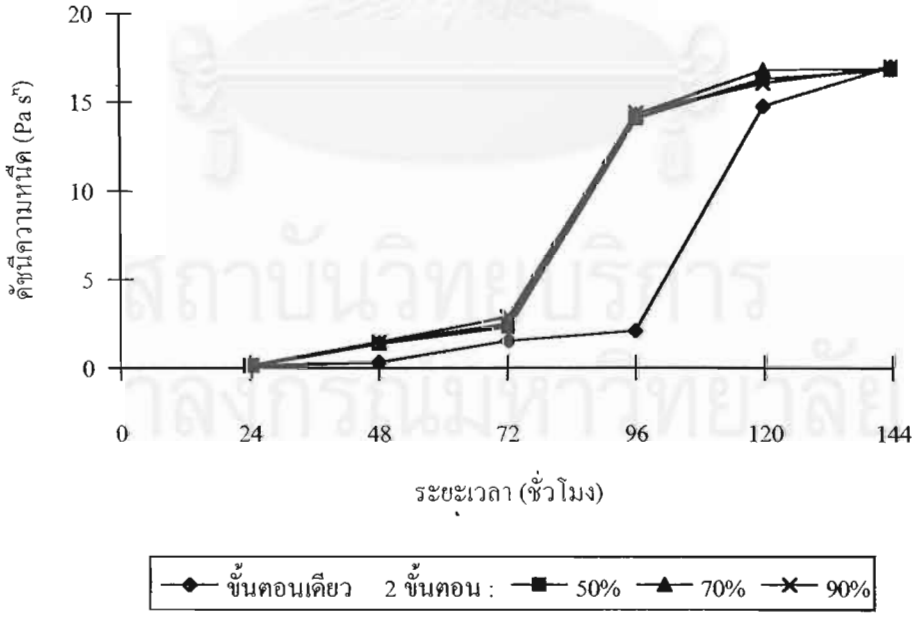
รูปที่ 19ข ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักเมื่อทำการผลิตแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียว และ 2 ขั้นตอนซึ่งแปรปริมาณเชื้อเท่ากับ 50 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 19ค การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเมื่อทำการผลิตแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียว และ 2 ขั้นตอนซึ่งแปรปริมาณเชื้อเท่ากับ 50. 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์

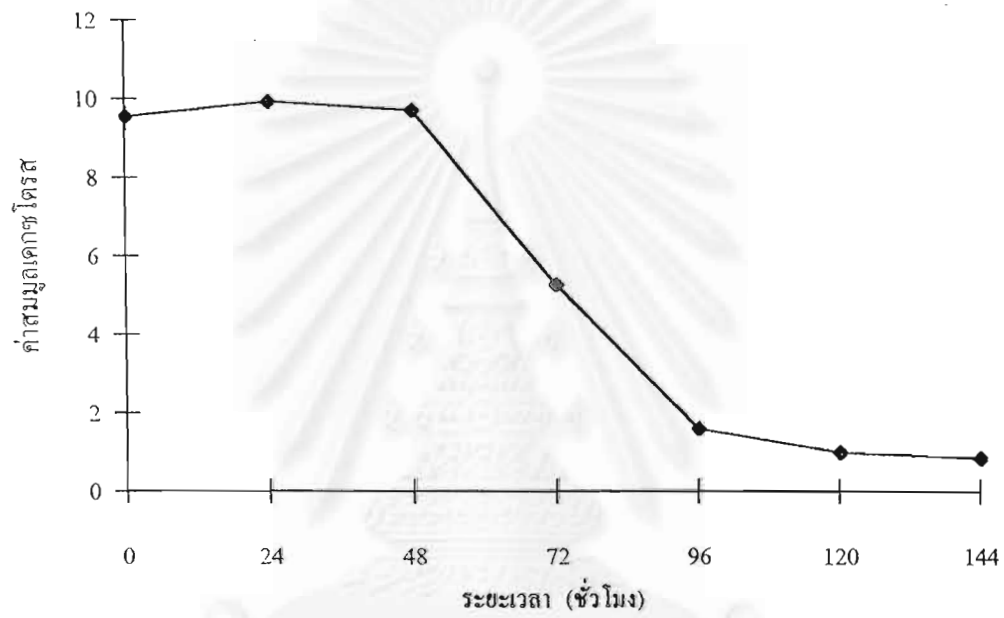


รูปที่ 19ง ปริมาณสารตะกอนในน้ำหมักเมื่อทำการผลิตแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียวและ 2 ขั้นตอนซึ่งแปรปริมาณเชื้อเท่ากับ 50 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 19จ ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อทำการผลิตแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียว และ 2 ขั้นตอนซึ่งแปรปริมาณเชื้อเท่ากับ 50 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า การเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 แบบขั้นตอนเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงที่ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร กรดซิตริก 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.10 กรัม/ลิตรมีความเหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมมากที่สุด และเมื่อนำสารตะกอนที่ได้ทดสอบค่าสมมูลเดกซโตรส (Dextrose equivalent : DE) พบว่าค่าสมมูลเดกซโตรสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยใน 24 ชั่วโมงแรกของการผลิตจากนั้นมีค่าลดลง และเมื่อสิ้นสุดการผลิตสารตะกอนให้ค่าสมมูลเดกซโตรส 0.85 (รูปที่ 20)

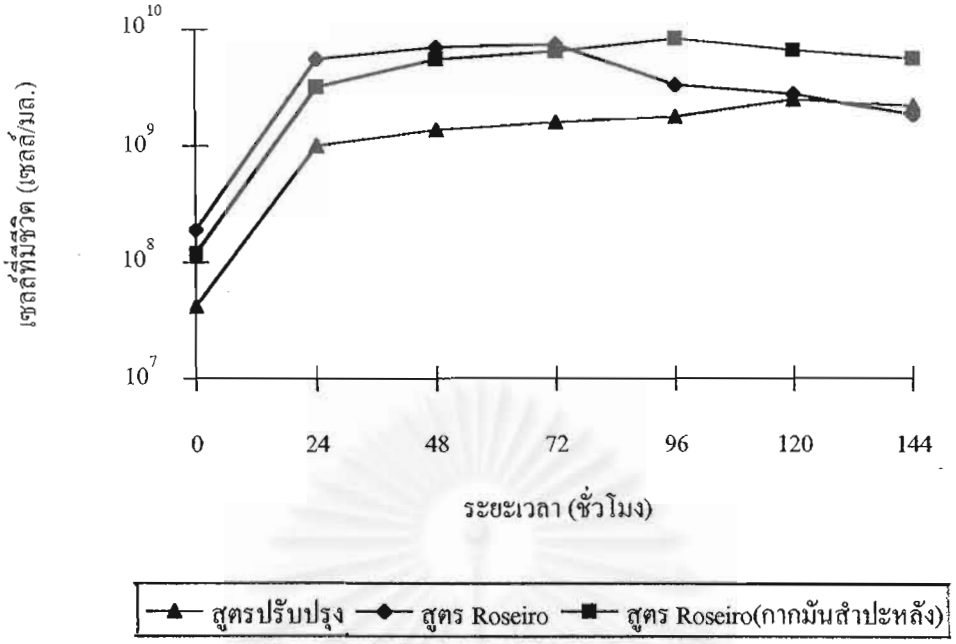


รูปที่ 20 ค่าสมมูลเดกซโตรสของสารตะกอนเมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร กรดซิตริก 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร

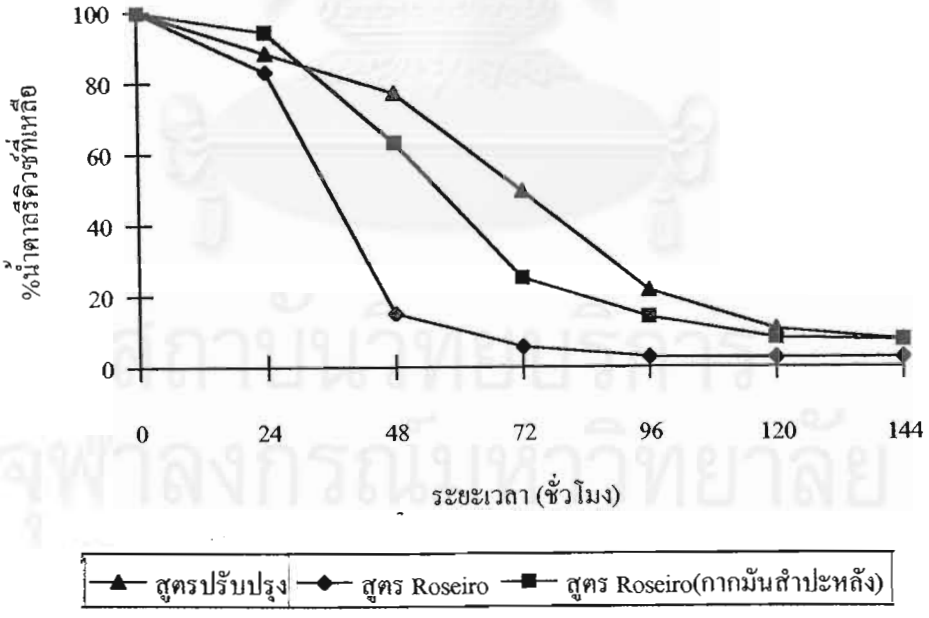
4.3.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการผลิตแซนแทนกัมเมื่อปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง (จากการทดลองที่ 4.3.2) ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro และการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุงเชื้อมีการเจริญต่ำที่สุดโดยมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 2.18×10^9

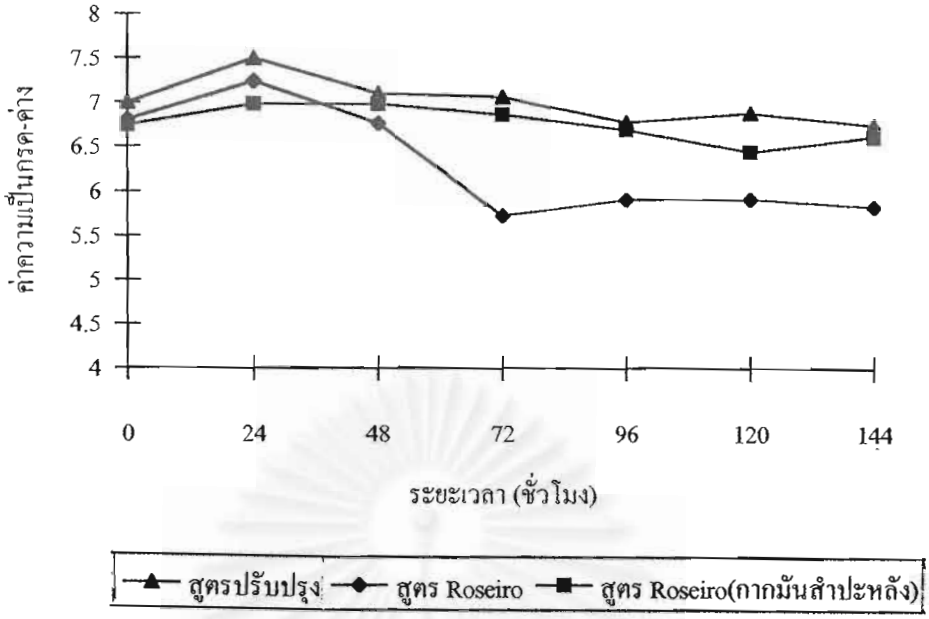
เซลล์/มิลลิลิตร และให้การเจริญคงที่ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกเช่นเดียวกับการเลี้ยงในสูตรอาหารของ Roseiro และการเลี้ยงในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro เชื้อมีการเจริญคงที่ในช่วง 24-72 ชั่วโมงแรกจากนั้นลดจำนวนลง และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 1.83 x 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร (รูปที่ 21 ก) โดยเชื้อสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้มากที่สุดและมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงชัดเจนที่ 48 ชั่วโมงของการผลิตแซนแทนกัม ซึ่งเมื่อสิ้นสุดการผลิตเหลือน้ำตาลรีดิวซ์อยู่เพียง 2.73 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 21 ข) ขณะที่การเลี้ยงในสูตรอาหารปรับปรุงเชื้อมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ช้ากว่าการเลี้ยงในสูตรอาหารของ Roseiro และการเลี้ยงในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่อสิ้นสุดการผลิตพบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับปรุงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในน้ำหมักใกล้เคียงการเลี้ยงในสูตรอาหารของ Roseiro ที่ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารทั้ง 2 นี้มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักค่อนข้างคงที่เหมือนกัน ส่วนการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหาร Roseiro นั้นให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลงจาก 6.81 เหลือ 5.82 เมื่อสิ้นสุดการผลิตแซนแทนกัม (รูปที่ 21 ค) และเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณสารตะกอนต่ำที่สุด โดยเริ่มมีปริมาณคงที่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 72 ของการผลิตและให้ปริมาณสารตะกอนเมื่อสิ้นสุดการผลิต เท่ากับ 9.26 กรัม/ลิตร ส่วนการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุงและในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารตะกอนที่คล้ายคลึงกัน โดยเมื่อสิ้นสุดการผลิตให้ปริมาณสารตะกอน 16.58 และ 18.67 กรัม/ลิตรตามลำดับ (รูปที่ 21 ง) สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมัก (รูปที่ 21 จ) พบว่าการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro ให้ค่าดัชนีความหนืดสูงสุด รองมาคือสูตรอาหารปรับปรุง และสูตรอาหารของRoseiroซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้ค่าดัชนีความหนืดเท่ากับ 20.50 Pa $s^{0.70}$ 16.99 Pa $s^{0.69}$ และ 10.07 Pa $s^{0.74}$ ตามลำดับ และให้ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9)



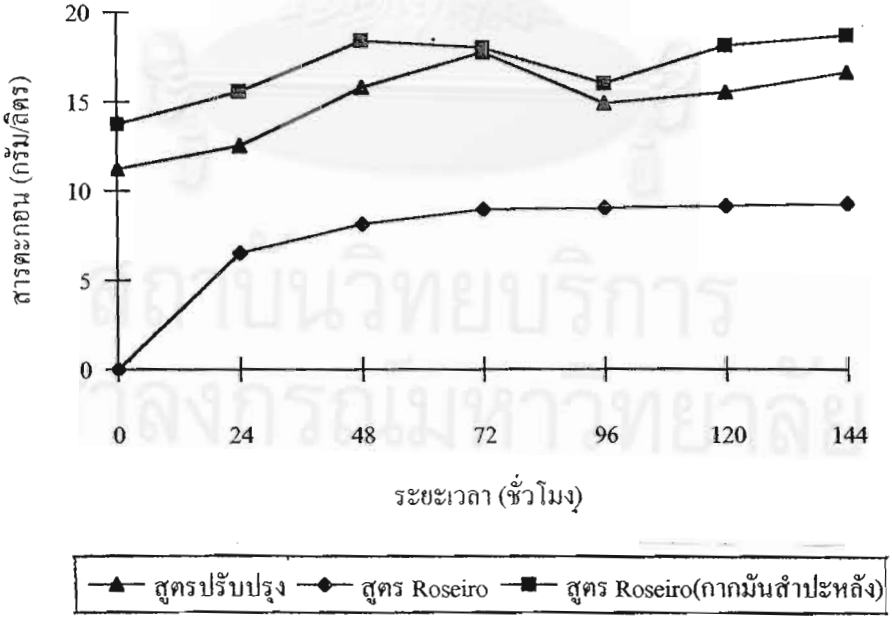
รูปที่ 21ก จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารสูตรปรับปรุง ในสูตรอาหารของ Roseiro และในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน



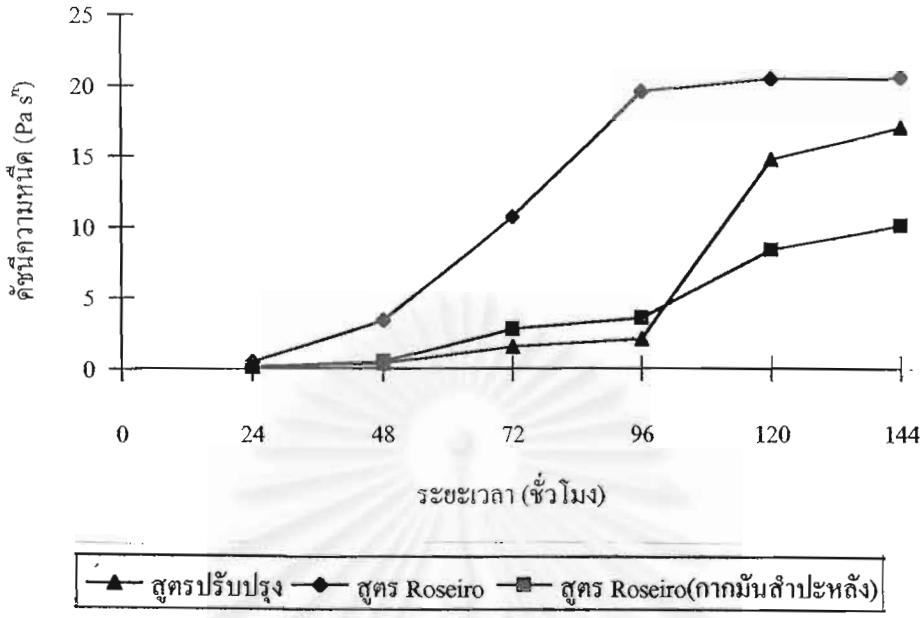
รูปที่ 21ข ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมัก เมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารสูตรปรับปรุง ในสูตรอาหารของ Roseiro และในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 21ค การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก เมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารสูตรปรับปรุง ในสูตรอาหารของ Roseiro และในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 21ง ปริมาณสารตะกอนในน้ำหมัก เมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารสูตรปรับปรุง ในสูตรอาหารของ Roseiro และในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 21จ ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมัก เมื่อเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารสูตรปรับปรุง ในสูตรอาหารของ Roseiro และในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 9 ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมัก ณ ชั่วโมงที่ 144 ของการเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง การเลี้ยงในสูตรอาหารของ Roseiro และการเลี้ยงในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

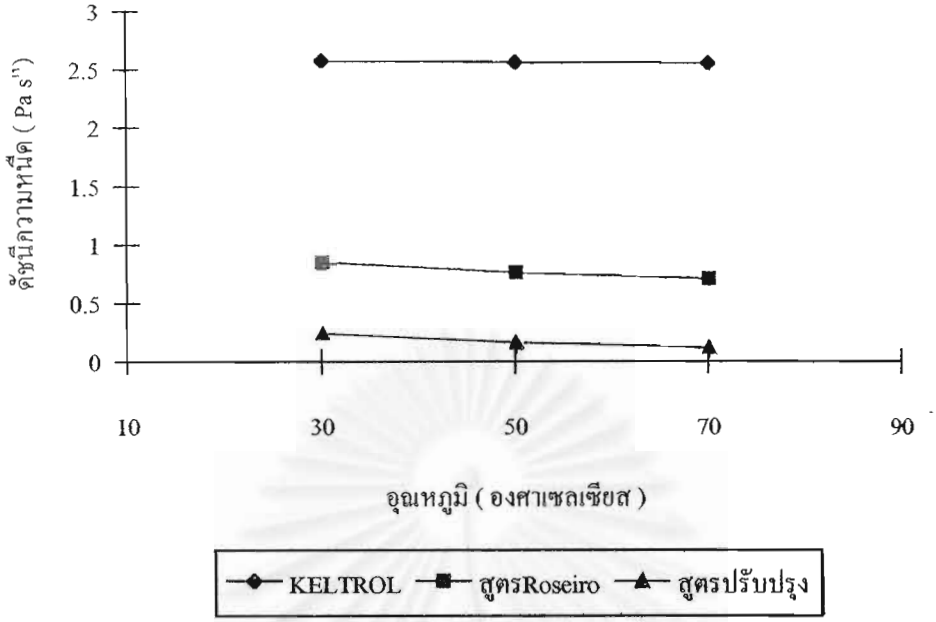
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	ดัชนีความหนืด (Pa s^n) ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน	n
สูตรปรับปรุง	16.99^{b} ± 0.94	0.69
สูตรของ Roseiro	20.50^{a} ± 1.71	0.70
สูตรของ Roseiro เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน	10.07^{c} ± 0.64	0.74

a,b... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

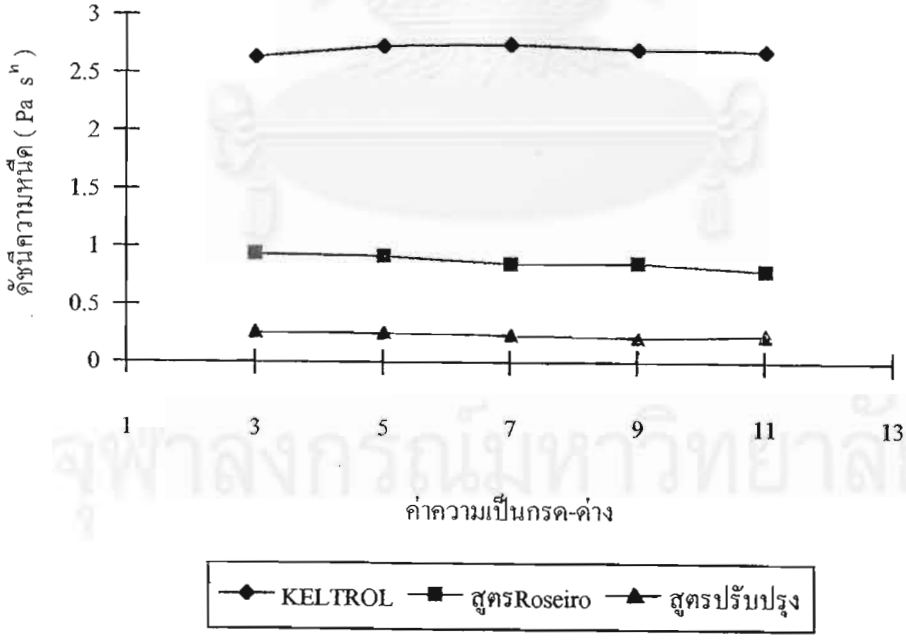
4.4 ศึกษาความคงตัวของความหนืดของแซนแทนกัม

เมื่อนำแซนแทนกัมที่ผลิตได้จากการเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในสูตรอาหารปรับปรุง ซึ่งได้จากข้อ4.3.2ทดสอบความสามารถในการคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆของสารละลาย เปรียบเทียบกับแซนแทนกัมซึ่งผลิตจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro และแซนแทนกัม KELTROL® ซึ่งเป็นแซนแทนกัมเกรดอาหาร พบว่าแซนแทนกัมที่ให้ค่าดัชนีความหนืดมากที่สุดคือ KELTROL® ซึ่งให้ค่าดัชนีความหนืดประมาณ 2.50 Pa $s^{0.50}$ รองมาคือแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งให้ค่าดัชนีความหนืดประมาณ 0.70 Pa $s^{0.60}$ และแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุงซึ่งให้ค่าดัชนีความหนืดประมาณ 0.20 Pa $s^{0.70}$ และเมื่อแปรอุณหภูมิของสารละลายเท่ากับ 30 50 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่า KELTROL® มีความคงตัวของความหนืดสูงสุด รองมาคือแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro และแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุง (รูปที่ 22 ก) ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายพบว่าแซนแทนกัมทั้ง 3 ชนิดมีความคงตัวสูงเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีความหนืดน้อยมาก (รูปที่ 22 ข) ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์นั้นทำให้ค่าดัชนีความหนืดของแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อด้วยสูตรอาหารของ Roseiro และอาหารสูตรปรับปรุงลดลงเล็กน้อย โดยให้ค่าดัชนีความหนืดที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ เท่ากับ 0.61 Pa $s^{0.64}$ และ 0.21 Pa $s^{0.78}$ ตามลำดับ (รูปที่ 22 ค)

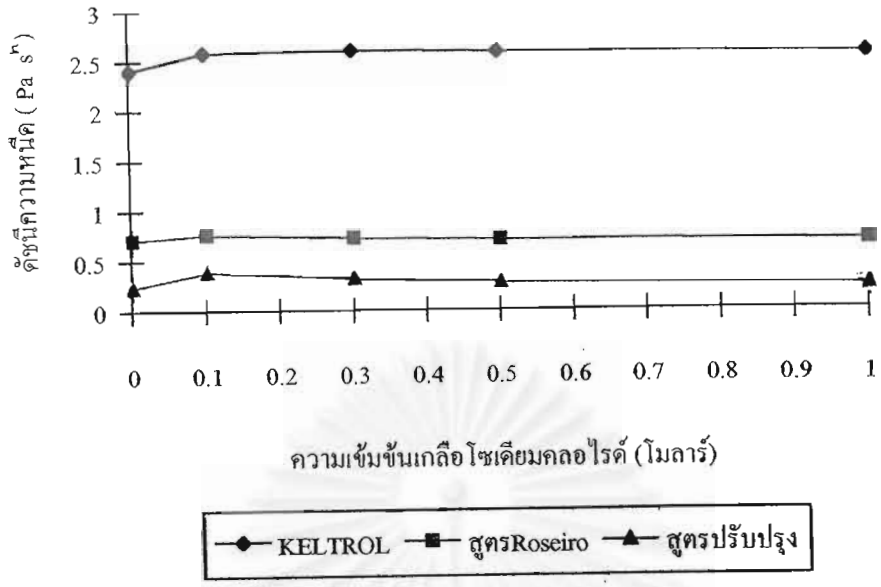
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22ก ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลายแซนแทนกัม KELTROL แซนแทนกัมจากการเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในสูตรอาหารของ Roseiro และแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุง



รูปที่ 22ข ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายแซนแทนกัม KELTROL แซนแทนกัมจากการเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในสูตรอาหารของ Roseiro และแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุง

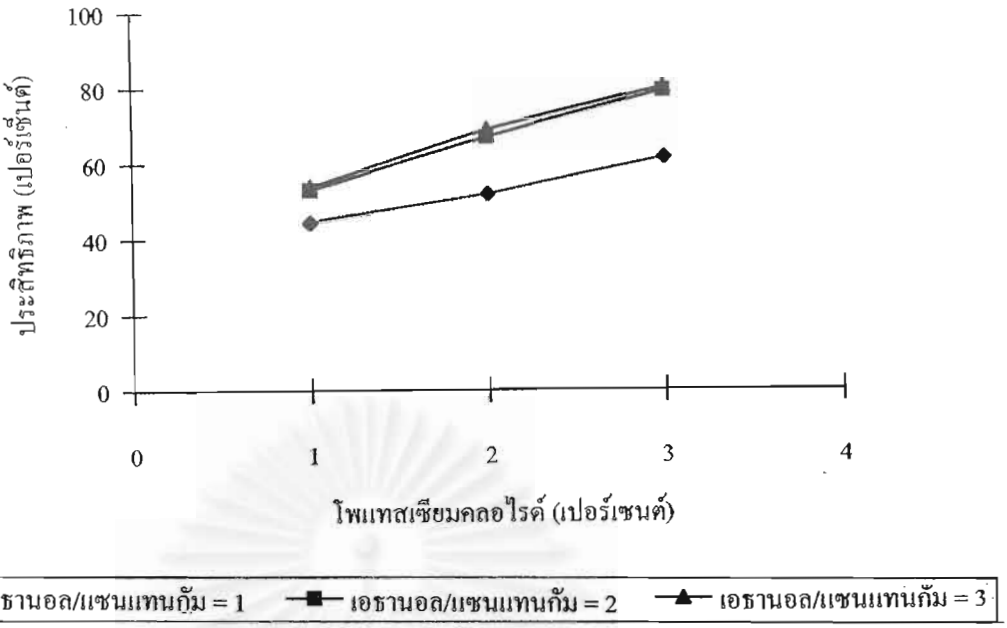


รูปที่ 22ค ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายแซนแทนกัม KELTROL แซนแทนกัมจากการเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในสูตรอาหารของ Roseiro และแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุง

4.5 ศึกษาวิธีการตกตะกอนแซนแทนกัม

เมื่อทำการตกตะกอนสารละลายแซนแทนกัมเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยการแปรอัตราส่วนปริมาตรเอธานอลที่ใช้ต่อปริมาตรสารละลายแซนแทนกัมเท่ากับ 1 2 และ 3 เท่าร่วมกับสารโพแทสเซียมคลอไรด์ 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าการเพิ่มอัตราส่วนเอธานอลจาก 1 เท่าเป็น 2 เท่าให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงขึ้น ขณะที่การเพิ่มอัตราส่วนจาก 2 เท่าเป็น 3 เท่าให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนไม่ต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 23 และตารางที่ 10) ส่วนการเพิ่มปริมาณโพแทสเซียมคลอไรด์นอกจากช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอนแล้วยังช่วยลดอัตราส่วนเอธานอลที่ใช้ลง โดยเมื่อใช้โพแทสเซียมคลอไรด์ 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการใช้เอธานอล 1 เท่าสามารถให้ประสิทธิภาพเท่ากับ และ มากกว่าการใช้โพแทสเซียม 1 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับเอธานอล 2 เท่าตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าการใช้เอธานอลในอัตราส่วน 2 เท่าร่วมกับโพแทสเซียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตกตะกอนมากที่สุดซึ่งสามารถให้ประสิทธิภาพในการตกตะกอนเท่ากับ 79.17 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 23 ประสิทธิภาพการตกตะกอนแซนแทนกัมเมื่อแปรปริมาตรเอธานอลต่อปริมาตรสารละลายแซนแทนกัมเท่ากับ 1 2 และ 3 ร่วมกับปริมาณเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ 1 2 และ 3 เปอร์เซนต์ในการตกตะกอน

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพการตกตะกอนสารละลายแซนแทนกัมเมื่อแปรอัตราส่วนโดยปริมาตรของเอธานอลต่อปริมาตรสารละลายแซนแทนกัม และปริมาณสารโพแทสเซียม-คลอไรด์ที่ใช้

ปริมาตรเอธานอล ปริมาตรแซนแทนกัม	โพแทสเซียมคลอไรด์ %(w/v)	ประสิทธิภาพการตกตะกอน (เปอร์เซ็นต์) ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน
1	1	$44.81^{e} \pm 1.91$
	2	$51.79^{d} \pm 1.80$
	3	$61.36^{c} \pm 0.41$
2	1	$53.22^{d} \pm 2.20$
	2	$67.05^{b} \pm 2.58$
	3	$79.17^{a} \pm 1.82$

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ปริมาตรเอธานอล ปริมาตรแซนแทนกัม	โพแทสเซียมคลอไรด์ %(w/v)	ประสิทธิภาพการตกตะกอน (เปอร์เซ็นต์) ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน
3	1	$54.10^{d} \pm 1.16$
	2	$69.08^{b} \pm 1.43$
	3	$80.28^{a} \pm 2.04$

a,b... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการผลิตแซนแทนกัมจากการเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดหรือเอนไซม์นั้น ในขั้นตอนของการเตรียมแหล่งคาร์บอนโดยการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ได้ดำเนินงานวิจัยโดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ตามผลงานวิจัยของ ชิดพงศ์ ประดิษฐสุวรรณ, สุเมธ ตันตระเธียร และโปรดปราณ สิริธีรศาสน์ (2540) ซึ่งใช้เอนไซม์ผสมของแอลฟาอะไมเลส 285.60 MWU (Modified Wohlgemuth Unit) / กรัมกากมันสำปะหลัง ร่วมกับกลูโคอะไมเลส 0.21 DU (Diazyme Unit) / กรัมกากมันสำปะหลัง และเซลลูเลส 15.48 NCU (Novo Celluclast Unit) / กรัมกากมันสำปะหลัง ส่วนการเตรียมแหล่งคาร์บอนโดยการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดนั้นมีเพียงสินีนารถ เจียมอนุกูลกิจ (2539) และ จิรวรรณ อภิรักษากร (2540) ที่ทำการศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังสดด้วยกรดและพบว่าควรใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์ร่วมกับการให้ความร้อน 115 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีจึงจะทำให้เกิดการเปลี่ยนกากมันสำปะหลังสดเป็นน้ำตาลกลูโคส 52.67 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ซึ่งใช้วัตถุดิบเป็นกากมันสำปะหลังแห้งจึงได้ทำการทดลองโดยแปรภาวะการย่อยให้ใกล้เคียงกับการย่อยกากมันสำปะหลังสด โดยคาดว่าภาวะที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังทั้ง 2 ชนิดควรมีความใกล้เคียงกัน ซึ่งเมื่อทำการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.5 1 และ 2 โมลาร์ ร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 110 และ 120 องศาเซลเซียส ทำการย่อยนาน 15 30 และ45 นาที (รูปที่ 11 ก 11 ข และ 11 ค) พบว่าทั้งความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการย่อยล้วนมีอิทธิพลต่อกัน โดยการเพิ่มความเข้มข้นของกรดจะส่งผลดีต่อประสิทธิภาพการการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ก็ต่อเมื่อใช้อุณหภูมิในการย่อยต่ำเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส หรือหากใช้อุณหภูมิในการย่อยสูงขึ้นเป็น 110 และ 120 องศาเซลเซียสจะต้องทำการย่อยโดยใช้เวลาน้อยที่สุดคือ 15 นาที แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของกรดสูงถึง 2 โมลาร์จะไม่เป็นผลดีต่อการย่อย ขณะที่การเพิ่มอุณหภูมิการย่อยจะให้ผลดีก็ต่อเมื่อทำการย่อยโดยใช้เวลาน้อย ส่วนการเพิ่มเวลาจะส่งผลดีเมื่อใช้ความเข้มข้นกรดและอุณหภูมิในการย่อยต่ำโดยเฉพาะเมื่อใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจะส่งผลดีต่อการย่อยทุกระดับของกรดที่ใช้ ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับผลการทดลองของ Tewari และ Marwaha (1988) ซึ่งรายงานว่าการใช้กรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้นมากกว่า 1 โมลาร์ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยชานอ้อยที่อุณหภูมิ 120องศาเซลเซียสลดลงและลดลงชัดเจนมากเมื่อใช้เวลาในการย่อยนานขึ้น และเมื่อเพิ่ม

ความเข้มข้นกรดเป็น 2 โมลาร์หากต้องการให้ประสิทธิภาพการย่อยดีที่สุดจะต้องทำการย่อยโดยใช้เวลาน้อยที่สุดคือ 15 นาที แต่หากลดความเข้มข้นลงน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 โมลาร์จะต้องทำการย่อยนาน 30 นาทีจึงจะให้ประสิทธิภาพสูงสุด Tsao และ Chou (1981) และ Tewari และ Marwaha (1988) ได้อธิบายว่าที่ผลการทดลองเป็นเช่นนี้เนื่องจากการย่อยที่รุนแรงเกินไปโดยใช้กรดและเวลาหรืออุณหภูมิการย่อยสูงสามารถส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงจากการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นสารอื่น (รูปที่ 2) ทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ลดลงจึงทำให้ประสิทธิภาพการย่อยต่ำลง ดังนั้นในการย่อยกากมันสำปะหลังจะต้องควบคุมความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการย่อยให้มีความเหมาะสม ซึ่งนอกจากจะทำให้ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดแล้วการใช้กรดที่มีความเข้มข้นพอเหมาะยังช่วยลดปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้และเกลือซัลเฟตที่เกิดขึ้นในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่ได้จากการย่อยให้ลดลง ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการนำสารละลายที่ได้จากการย่อยไปใช้งานต่อ (กล้าณรงค์ ศรีรอต, 2538 และTsao and Chou, 1981) โดยจากงานวิจัยนี้พบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์ร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีให้ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 93.60 เปอร์เซ็นต์

โดยทั่วไปก่อนที่จะนำสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาใช้จะต้องผ่านการฟอกสีและแยกเกลือที่เกิดจากการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างออกด้วย ion exchange rasin (สุวัฒน์ ลิ้มสุวรรณ, 2534) เพื่อให้สารละลายกลูโคสมีความบริสุทธิ์เหมาะต่อการใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ แต่จากการสังเกตพบว่า *X. campestris* TISTR 840 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถเจริญในสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ได้ดี จึงไม่จำเป็นต้องทำให้สารละลายน้ำตาลกลูโคสมีความบริสุทธิ์ก่อนโดยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถให้การเจริญเมื่อเข้าสู่ช่วงการผลิตแซนแทนกัมที่ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 2.00×10^9 เซลล์/มิลลิลิตร ขณะที่การเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงกว่า (กล้าณรงค์ ศรีรอต, 2538) ให้การเจริญเท่ากับ 5.50×10^9 เซลล์/มิลลิลิตร (รูปที่ 12 ก) โดยเชื้อสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักได้เกือบหมด 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การเลี้ยงเชื้อโดยการใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้เพียง 80 เปอร์เซ็นต์ และการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถให้การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักชัดเจนกว่า(รูปที่ 12 ข) ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักนี้สามารถใช้ในการทำนายประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมได้ โดยหากเชื้อสามารถผลิตแซนแทนกัมได้มากหรือผลิตแซนแทนกัมที่มีคุณภาพสูงจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลงจาก

การสะสมสารประเภทกรด เช่น กรดกลูโคโรนิก แอซีติก และไพรูวิค ซึ่งเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของแซนแทนกัม (Kang and Cottrell, 1979 cited in Pettitt, 1979) แสดงว่าการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนน่าจะมีความสามารถในการผลิตแซนแทนกัมสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด ถึงแม้ว่าการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดจะให้ปริมาณสารตะกอนเมื่อสิ้นสุดการผลิตสูงกว่าถึงประมาณ 3 เท่าก็ตาม (รูปที่ 12 ค) แต่ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถใช้ปริมาณสารตะกอนในการวัดประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมได้เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นที่ใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังนอกจากประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสแล้วยังมีสารออลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharide) ผสมอยู่ด้วย ซึ่งสารออลิโกแซ็กคาไรด์นี้สามารถถูกตกตะกอนได้ด้วยเอธานอลเช่นเดียวกับแซนแทนกัม (Gonzales, 1989) โดยจากการทดลองพบว่าเอธานอลทำให้สารออลิโกแซ็กคาไรด์ตกตะกอนแยกออกจากสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังและเกิดตะกอนที่มีลักษณะคล้ายแป้ง ดังนั้นปริมาณสารตะกอนที่เก็บเกี่ยวได้นั้นจึงเป็นน้ำหนักรวมของสารออลิโกแซ็กคาไรด์ที่เหลือจากการย่อยกากมันสำปะหลังตกตะกอนปนรวมกับแซนแทนกัมที่ผลิตได้และไม่สามารถระบุได้ว่าน้ำหนักจริงของแซนแทนกัมเป็นเท่าใด ในการวัดประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมนั้นนอกจากการวัดปริมาณสารตะกอนซึ่งไม่สามารถใช้ในงานวิจัยนี้แล้ว ยังสามารถวัดได้จากการให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมัก ซึ่ง ภาวินี โลหะนะ (2524), Rogovin และคณะ (1961) และ Peters และคณะ (1989)ได้รายงานว่าแบคทีเรียที่สร้างสารพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทที่ขับออกนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว สารพอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวจะแพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีความหนืดเพิ่มขึ้น ซึ่งการให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักสูงจะหมายถึงเชื้อสามารถผลิตแซนแทนกัมได้ปริมาณมากและหรือสามารถผลิตแซนแทนกัมที่มีคุณภาพสูง (Flores, Torres and Galindo, 1994) ซึ่งการแสดงสมบัติด้านความหนืดนั้นเป็นลักษณะทางกายภาพเฉพาะของแซนแทนกัมที่สารออลิโกแซ็กคาไรด์ไม่สามารถแสดงลักษณะความหนืดเช่นแซนแทนกัมได้ (Pittitt, 1979) ดังเช่นผลการวัดความหนืดของน้ำหมักเมื่อเริ่มการผลิตแซนแทนกัม (ที่ 0 ชั่วโมง) จากการเลี้ยงเชื้อในสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดที่มีปริมาณสารตะกอนซึ่งเป็นสารออลิโกแซ็กคาไรด์เพียงอย่างเดียวอยู่ถึง 43.85 กรัม/ลิตร แต่สามารถให้ค่าความหนืดเมื่อวัดที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสได้เพียง 1 mPa s ขณะที่หากมีแซนแทนกัมเพียง 10 กรัม/ลิตรสามารถให้ความหนืดได้สูงถึง 800-1000 mPa s (Kang and Cottrel, 1979) และจากผลการทดลองให้ผลชัดเจน ว่าการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลัง

ด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถให้ค่าดัชนีความหนืดได้ตั้งแต่ที่ 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยง และเมื่อสิ้นสุดการผลิตที่ 192 ชั่วโมงให้ค่าดัชนีความหนืดมากกว่าการเลี้ยงโดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 5 เท่า แสดงว่าการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนมีประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมสูงกว่า ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสารละลายกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดมีความบริสุทธิ์ต่ำ มีสารผลิตภัณฑ์ข้างเคียงและเกลือโซเดียมซัลเฟตซึ่งเกิดจากการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างสูงถึง 0.82 โมลาร์ สารต่างๆเหล่านี้ถึงแม้ไม่มีผลต่อการเจริญแต่กลับไม่เอื้ออำนวยต่อการผลิตแซนแทนกัม ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของสินีนารถ เจียมอนุกูลกิจ (2539) ที่รายงานว่าการมีเกลือโซเดียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงกว่า 0.01 โมลาร์ สามารถส่งผลให้การผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ลดลงได้โดยไม่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อแต่อย่างใด

เมื่อนำสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ไปใช้ในการเลี้ยง *X. campestris* TISTR 840 เพื่อศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม พบว่ากรณีที่ใช้ปริมาณไนโตรเจนในอาหารสูงเชื้อจะมีการเพิ่มจำนวนมากกว่ากรณีที่ใช้ไนโตรเจนต่ำเพียงใน 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเท่านั้น หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญจนมีจำนวนเท่ากันคือมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต 10^9 เซลล์/มิลลิลิตรจนสิ้นสุดการผลิตแซนแทนกัม (รูปที่ 13 ก 13 ข และ 13 ค) โดยเชื้อจะมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์และให้การผลิตแซนแทนกัมที่แตกต่างกันซึ่งสังเกตได้จากการให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมัก (รูปที่ 17 ก 17 ข และ 17 ค) ซึ่งผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับผลการทดลองของ Moraine และ Rogovin (1973) ซึ่งอ้างถึงใน Pinches และ Pallent (1986), Vuyst, Loo และ Vandamme (1987), Jana และ Ghosh (1995) และ Lo, Yang และ Min (1997) ซึ่งรายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบถังหมักที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงจะทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีและส่งเสริมให้เกิดการสร้างแซนแทนกัมสูงไปด้วย ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้ทำการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าซึ่งมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักน้อยกว่าการเลี้ยงในระบบถังหมักที่มีการให้อากาศและกวนด้วยอัตราเร็วสูง (สมใจ ศิริโภค, 2537) โดยเฉพาะเมื่อเริ่มมีการผลิตแซนแทนกัม แซนแทนกัมจะทำให้ความหนืดของน้ำหมักเพิ่มขึ้นขัดขวางการละลายออกซิเจนลงสู่น้ำหมัก (Peters et al., 1989) ทำให้ออกซิเจนในระดับขวดเขย่าไม่เพียงพอต่อการสร้างเซลล์ ซึ่งโดยปกติเชื้อจะใช้ออกซิเจนเพื่อสังเคราะห์เซลล์ใหม่และสังเคราะห์พลังงานเพื่อใช้ในการดำรงชีวิตและสร้างแซนแทนกัม (Jana and Ghosh, 1995) แต่เมื่อเชื้อเจริญพ้น 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงและเริ่มมีการผลิตแซนแทนกัมแล้วโดยสังเกตได้จากการให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมัก (รูปที่ 17 ก 17 ข และ 17 ค) เชื้อจึงนำออกซิเจนซึ่งมีอยู่ในปริมาณจำกัดนี้ไปใช้ในการสร้างแซนแทนกัมต่อ และใช้ในการดำรง

ชีวิตมากกว่าที่จะนำไปสร้างเซลล์ใหม่ ซึ่งลักษณะการใช้ออกซิเจนและน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อนั้นมีความคล้ายคลึงกัน โดย Jana และ Ghosh (1995) ได้รายงานว่าน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักส่วนหนึ่งจะถูกเชื้อนำไปใช้ในการสร้างเซลล์และการดำรงชีวิตและอีกส่วนหนึ่งนำไปใช้ในการผลิตแซนแทนกัม โดยจะสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไปในทางใดมากกว่ากันนั้นขึ้นกับประสิทธิภาพของเชื้อในสภาวะการเลี้ยงนั้นๆ ซึ่งจากการทดลองพบว่าในกรณีที่เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงเชื้อสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้น้อยกว่ากรณีที่มีไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ ทั้งๆที่มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใกล้เคียงกัน (รูปที่ 14 ก 14 ข และ 14 ค) และเมื่อพิจารณาที่การให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักพบว่าในกรณีที่เลี้ยงเชื้อโดยใช้ไนโตรเจนในอาหารต่ำจะทำให้น้ำหมักมีค่าดัชนีความหนืดสูงโดยให้ผลชัดเจนเมื่อลดแอมโมเนียมซัลเฟตเหลือ 3 และ 1 กรัม/ลิตร แสดงว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไนโตรเจนน้อยให้การผลิตแซนแทนกัมได้ดีกว่า ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับผลการทดลองของ Jana และ Ghosh (1995) ที่ทำการทดลองผลิตแซนแทนกัมโดยใช้ *X. campestris* S4L-11ในระดับถังหมักแล้วพบว่า การเพิ่มสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (โดยลดปริมาณไนโตรเจนลง) จาก 10 เป็น 25 ทำให้เชื้อมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้นและสามารถผลิตแซนแทนกัมได้มากขึ้น 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Roseiro และคณะ (1993) ได้เสนอว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแซนแทนกัมนั้นควรมีสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 โดยสามารถผลิตแซนแทนกัมได้ 11 กรัม/ลิตร ซึ่งปริมาณสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ใช้ในงานวิจัยนี้เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตรมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยวิจัยของ Roseiro โดยให้สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 22 แสดงว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนต่ำทำให้เชื้อมีประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมสูงและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไปนี้ควรถูกนำไปใช้ในการสร้างแซนแทนกัมมากกว่าการสร้างเซลล์หรือดำรงชีวิต ซึ่ง Jana และ Ghosh (1995) ได้รายงานไว้ว่าในระบบการเลี้ยงที่มีไนโตรเจนสูง ไนโตรเจนและกลูโคสจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์ของเชื้อและเชื้อจะใช้น้ำตาลกลูโคสส่วนหนึ่งในการดำรงชีวิต แต่หากในระบบมีไนโตรเจนต่ำน้ำตาลกลูโคสส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในการสร้างแซนแทนกัมและมีน้ำตาลกลูโคสเพียงบางส่วนถูกใช้ในการดำรงชีวิตของเชื้อ โดย Pinches และ Pallent (1986), Roseiro และคณะ (1993) และ Salam, Fadel และ Murad (1994) เสนอว่าการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อจะส่งผลโดยตรงต่อปริมาณแซนแทนกัมที่ผลิตได้ โดยหากเชื้อสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้มากจะส่งผลให้ผลิตแซนแทนกัมได้ในปริมาณมากขึ้นด้วย สำหรับกรดซิตริกและแมกนีเซียมที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นพบว่าจะส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมแตกต่างกัน โดยการลดปริมาณกรดซิตริกในอาหารลงจะให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการลดปริมาณไนโตรเจน โดยจะทำให้เชื้อมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้น และส่งผลให้น้ำหมักมีค่าดัชนีความหนืดสูงขึ้นโดยไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก ส่วนการลดปริมาณแมกนีเซียมที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อลงจะส่งผลให้น้ำหมักมีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงและให้ดัชนีความหนืดของน้ำหมักสูงขึ้นโดยไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณการใช้น้ำตาลรีดิวซ์แต่อย่างใด ซึ่งทั้งการลดปริมาณไนโตรเจน กรดซิตริก และแมกนีเซียมลงนี้ล้วนทำให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักเพิ่มขึ้นซึ่งอาจหมายถึงสามารถผลิตแซนแทนกัมได้มากและหรือสามารถผลิตแซนแทนกัมที่มีคุณภาพสูง (Flores, Torres and Galindo, 1994) แต่เนื่องจากการลดปริมาณแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อลงไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อซึ่งมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มปริมาณแซนแทนกัม (Pinches and Pallent, 1986 ; Roseiro et al., 1993 and Salam, Fadel and Murad, 1994) แสดงว่าการลดปริมาณแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตแซนแทนกัมในด้านคุณภาพเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Garcia, Santos และ Fritsch (1992) ซึ่งทำการแปรปริมาณแมกนีเซียมในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1.06 3.19 และ 5.32 มิลลิโมล/ลิตร พบว่าแมกนีเซียมไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแซนแทนกัมที่ผลิตได้ และจากผลการทดลองที่ได้นี้ยังพบว่าการใช้แมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต 0.10 กรัม/ลิตรสามารถให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักได้สูงสุด สอดคล้องกับผลการทดลองของ ศศิธร โชติศศิธร (2536) ซึ่งรายงานว่าการเติมแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างแซนแทนกัม และการใช้แมกนีเซียม 0.10 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้งเชื้อเป็นปริมาณความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตแซนแทนกัม ส่วนการลดปริมาณไนโตรเจนและกรดซิตริกในอาหารเลี้ยงเชื้อลงจะส่งผลต่อการผลิตแซนแทนกัมในด้านปริมาณมากกว่าคุณภาพ โดยไม่สามารถให้ผลการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักได้เช่นเดียวกับการใช้แมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตรร่วมกับกรดซิตริก 2 กรัม/ลิตรและแมกนีเซียมซัลเฟต 0.10 กรัม/ลิตรเป็นสูตรอาหารที่ให้ประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณมากที่สุด

ในงานวิจัยนี้แม้ว่าไม่สามารถนำสารตะกอนมาใช้ในการพิจารณาประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อได้ แต่เมื่อสังเกตจะพบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารตะกอนมีความสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก คือ ในช่วงที่น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มหมดในช่วงท้ายของการผลิตประมาณ 72-120 ชั่วโมงปริมาณสารตะกอนจะลดลงชัดเจนและเพิ่มสูงขึ้นมากในชั่วโมงการผลิตถัดไปเป็นเช่นนี้ทุกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ในกรณีที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร กรดซิตริก 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.10 กรัม/ลิตรสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้เกือบหมดที่ 96 ชั่วโมงของการผลิต (รูปที่ 14 ค) ขณะเดียวกันปริมาณสารตะกอนก็ลดลงชัดเจนที่ชั่วโมงนี้เช่นกันจาก 17.74 กรัม/ลิตรในชั่วโมงที่ 72 เหลือ 14.89 กรัม/ลิตรในชั่วโมงที่ 96 และ

เพิ่มสูงขึ้นเป็น 15.49 ในชั่วโมงที่ 120 (รูปที่ 16 ค) ณ จุดที่ปริมาณสารตะกอนลดจำนวนลงและเพิ่มสูงขึ้นอีกนี้น่าจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและหรือคุณภาพของแซนแทนกัมที่ผลิตได้โดยเป็นช่วงที่ให้ประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมสูงที่สุด ซึ่งหากพิจารณาร่วมกับค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักแล้วจะพบว่าให้ผลสนับสนุนสมมุติฐานข้างต้น โดยดัชนีความหนืดจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นชัดเจนอย่างมากในช่วงเดียวกับที่มีการลดและเพิ่มปริมาณสารตะกอน (รูปที่ 17 ค) และเพื่อให้แน่ใจว่าสมมุติฐานนี้ถูกต้องจึงทำการทดสอบค่าสมมูลเดกซโตรสของสารตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร กรดซิตริก 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.10 กรัม/ลิตรซึ่งเป็นสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมสูงที่สุด ซึ่งค่าสมมูลย์เดกซโตรสนี้เป็นค่าที่ใช้ในการบอกปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเทียบเท่าน้ำตาลเดกซโตรสที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยใช้การตรวจวัดด้วยวิธีรีดักชัน (กล้าณรงค์ ศรีรอต, 2538) ซึ่งโดยปกติแล้วแซนแทนกัมเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่มีหมู่รีดิวซ์น้อย หากในสารตะกอนที่ผลิตได้มีแซนแทนกัมมากยิ่งจะทำให้ตรวจวัดค่าสมมูลเดกซโตรสได้น้อย ส่วนสารพวกออลิโกแซ็กคาไรด์ที่ปนมากับสารตะกอนจะทำให้ตรวจค่าสมมูลเดกซโตรสได้มาก เนื่องจากสารออลิโกแซ็กคาไรด์มีโมเลกุลเล็กกว่าแซนแทนกัมและสายโมเลกุลมีขนาดสั้นทำให้มีหมู่รีดิวซ์มาก ซึ่งเมื่อนำสารตะกอนที่ได้ทดสอบค่าสมมูลเดกซโตรสพบว่าค่าสมมูลเดกซโตรสลดลงตลอดเวลาการผลิต โดยในวันแรกค่าสมมูลเดกซโตรสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเนื่องจากเกิดการย่อยสารออลิโกแซ็กคาไรด์จากการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อซึ่งเกิดควบคู่กับการเจริญ ทำให้โมเลกุลของสารออลิโกแซ็กคาไรด์สั้นลงและมีหมู่รีดิวซ์มากขึ้น และหลังจาก 24 ชั่วโมงแรกของการผลิตเชื้อมีการสร้างแซนแทนกัมมากขึ้นทราบได้โดยการให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมัก จึงทำให้วัดค่าสมมูลเดกซโตรสได้น้อยลงและลดลงมากในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารตะกอน โดยชั่วโมงที่สารตะกอนมีปริมาณมากที่สุดสามารถให้ค่าสมมูลเดกซโตรส 5.26 ชั่วโมงที่ปริมาณสารตะกอนลดลงชัดเจนให้ค่าสมมูลเดกซโตรสเท่ากับ 1.59 และให้ค่าเท่ากับ 0.99 เมื่อสารตะกอนเพิ่มปริมาณขึ้นอีกในชั่วโมงการผลิตถัดไป (รูปที่ 20)

แซนแทนกัมนั้นเกิดจากการสังเคราะห์ของเซลล์จุลินทรีย์ หากทำให้เชื้อมีปริมาณมากย่อมทำให้เกิดการผลิตแซนแทนกัมมากตามไปด้วย ซึ่งอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงสูตรปรับปรุงซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร กรดซิตริก 2 กรัม/ลิตร และ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.10 กรัม/ลิตรที่คัดเลือกได้นี้มีความเหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมมากกว่าการเจริญ ซึ่งหากทำให้ระบบเอื้ออำนวยต่อทั้งการผลิตแซนแทนกัมและการเจริญควบคู่กันไปน่าจะทำให้ประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมสูงขึ้นได้อีก แม้ว่าจากผลการทดลองในการศึกษาสูตรอาหารข้างต้นจะพบว่า สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้การเจริญมากไม่ได้ให้การผลิตแซนแทน

กัมมากตาม ซึ่งในการผลิตแซนแทนกัมนั้นประสิทธิภาพการผลิตไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อเพียงอย่างเดียวแต่ยังขึ้นกับสภาวะของระบบการผลิต เช่น การแพร่ออกซิเจนและสารอาหารซึ่งมักถูกขัดขวางโดยความหนืดของน้ำหมัก (Peters et al., 1989) รวมทั้งการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ต่างกัน (Roseiro, 1992) สภาวะเหล่านี้หากไม่เหมาะต่อการผลิตแซนแทนกัมจะทำให้ผลการผลิตต่ำแม้จะมีปริมาณเชื้อในระบบสูงก็ตาม แต่หากทำการเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันระบบที่มีปริมาณเชื้อมากควรให้การผลิตแซนแทนกัมมาก เช่นในการทดลองของ Vuyst, Loo และ Vandamme (1987) ซึ่งแยกวิธีการผลิตแซนแทนกัมเป็น 2 ขั้น กระตุ้นให้เกิดการเจริญของเชื้อมากในขั้นแรกทำให้ผลผลิตแซนแทนกัมเพิ่มจาก 0.22 กรัม/กรัมเซลล์ เป็น 0.33 กรัม/กรัมเซลล์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการปรับปรุงการเลี้ยงเชื้อโดยกระตุ้นให้เกิดการเจริญของเชื้อมากใน 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงโดยการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเท่ากับ 5 กรัม/ลิตร ซึ่งเมื่อถ่ายเชื้อลงในอาหารสูตรปรับปรุงซึ่งเหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัม พบว่า การมีเชื้อเข้าสู่ในระบบมากหรือน้อยไม่ส่งผลต่อการผลิตแซนแทนกัมแต่อย่างใด โดยในระบบที่มีการกระตุ้นให้เกิดการเจริญก่อนนั้นเชื้อมีการเจริญเข้าสู่ stationary phase แล้วดังนั้นเมื่อถ่ายเชื้อลงสู่อาหารใหม่จึงยังคงมีการเจริญคงที่ตลอดเวลาการผลิตและให้ปริมาณเชื้อใกล้เคียงกับระบบการผลิตแบบขั้นตอนเดียวที่ไม่มีการกระตุ้นการเจริญ (รูปที่ 19 ก) เป็นไปได้ว่า *X. campestris* TISTR 840 ซึ่งใช้ในงานวิจัยนี้มีความสามารถในการเจริญได้สูงสุดแล้วที่ 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร ดังนั้นจึงไม่ให้ผลการผลิตแซนแทนกัมที่ต่างไปจากเดิมเพียงแต่มีการย่นเวลาในการแสดงผลต่างๆเร็วกว่าในระบบการผลิตแบบขั้นตอนเดียว 24 ชั่วโมง เนื่องจากเชื้อที่เข้าสู่ระบบการผลิตในขั้นที่ 2 มีอายุมากกว่าในระบบการผลิตแบบขั้นตอนเดียว 24 ชั่วโมงจึงให้ผลการทดลองที่เร็วกว่า ดังนั้นการกระตุ้นให้เกิดการเจริญของเชื้อก่อนไม่ช่วยให้ประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมสูงขึ้น

ในการผลิตแซนแทนกัมโดยการเลี้ยงเชื้อในสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น พบว่าการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร กรดซิตริก 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.10 กรัม/ลิตร สามารถให้ผลการผลิตแซนแทนกัมดีกว่าการเลี้ยงในสูตรอาหารของ Roseiro โดยให้ค่าดัชนีความหนืดเมื่อสิ้นสุดการผลิตสูงกว่า 1.50 เท่า (รูปที่ 21 จ) แม้ว่าการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro จะให้การเจริญมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุง 3 เท่าก็ตาม (รูปที่ 21 ก) แต่เมื่อพิจารณาผลการทดลองในการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก และการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารตะกอนของการเลี้ยงเชื้อในอาหารทั้ง 2 สูตรกลับมีลักษณะที่คล้ายกัน (รูปที่ 21 ข 21 ค และ 21 ง) แม้ว่าการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro จะมีการลดลงในช่วงแรกสูงกว่า ซึ่งเป็นผลจากเชื้อต้องการน้ำตาลรีดิวซ์ใน

การดำรงชีวิตที่มีอยู่มากนั้นมากกว่า สูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งเป็นสูตรอาหารพื้นฐานที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้ผ่านการกำหนดสูตรโดยทดลองแปรปริมาณธาตุอาหารจากการสำรวจสูตรอาหารที่เคยใช้ในอดีต (ก่อนปี 1992) เพื่อคัดเลือกสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมโดย *X. campestris* NRRL B-1459 ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน (Roseiro et al., 1992) ซึ่งสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อนี้เมื่อถูกเปลี่ยนสภาวะ เปลี่ยนสายพันธุ์เชื้อ และแหล่งคาร์บอน ย่อมทำให้ความสามารถของสูตรอาหารเปลี่ยนไป การใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากสารชีวภาพจึงต้องมีการปรับเปลี่ยนธาตุอาหารให้เหมาะสมแตกต่างจากเดิม และแม้จะใช้สายพันธุ์เชื้อและแหล่งคาร์บอนซึ่งมีชนิดและปริมาณเดียวกันในการเลี้ยงเชื้อ แต่หากมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมเปลี่ยนแปลงไป (Souw and Demain, 1979 ; Roseiro et al., 1993 and Vuyst and Vermeire, 1994)

แม้ว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับปรุงจะให้ประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมสูงกว่าการเลี้ยงในสูตรอาหารของ Roseiro เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกับการเลี้ยงในสูตรอาหารของ Roseiro ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าสูตรอาหารปรับปรุงนี้ให้ผลการทดลองด้อยกว่าทุกๆด้าน แม้ว่าการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro ให้ปริมาณของสารตะกอนน้อยกว่าแต่สารตะกอนที่ได้นั้นเป็นแซนแทนกัมเพียงอย่างเดียว ดังนั้นแซนแทนกัมที่ผลิตได้จึงมีความบริสุทธิ์สูงกว่า แสดงว่าแม้จะมีการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเหมาะสมแล้วการผลิตแซนแทนกัมจะให้ผลดีก็ต่อเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนประเภทเดียวกันเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่าสูตรอาหารกลับไม่ใช่ตัวกำหนดประสิทธิภาพการผลิตแต่กลับเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ ในการผลิตแซนแทนกัมโดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารปรับปรุงแม้จะให้ค่าดัชนีความหนืดน้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อโดยใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารของ Roseiro แต่การให้ค่าดัชนีความหนืดสูงถึง 16.99 Pa $s^{0.69}$ เป็นค่าที่น่าพอใจ ซึ่งอาจทำให้การผลิตมีประสิทธิภาพสูงกว่านี้ได้อีกถ้ามีการทำบริสุทธิ์สารละลายน้ำตาลกลูโคสก่อนที่จะนำมาเลี้ยงเชื้อ

และเมื่อนำแซนแทนกัมที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุงนี้ทดสอบสมบัติทางกายภาพในการคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เปรียบเทียบกับแซนแทนกัมที่ผลิตจากสูตรอาหารของ Roseiro ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน และแซนแทนกัม KELTROL® แล้วพบว่าแซนแทนกัมทั้ง 3 ชนิดมีสมบัติในการคงความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงภาวะของสารละลายใกล้เคียงกัน โดย KELTROL® ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยมากที่สุด (ภาคผนวก ข) สามารถให้ค่าดัชนี

ความหนืดสูงสุด ซึ่ง Milas, Rinando และTinland (1985) รายงานว่าความหนืดของสารละลายแซนแทนกัมขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล แซนแทนกัมที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากสามารถให้ความหนืดที่สูงกว่าแซนแทนกัมที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย โดย Peters และคณะ (1989) รายงานว่าน้ำหนักโมเลกุลของแซนแทนกัมจะขึ้นกับปริมาณออกซิเจนที่มีในระบบ โดยเมื่อเพิ่มอัตราการกวนจาก 200 รอบ/นาที เป็น 800 รอบ/นาที ทำให้แซนแทนกัมมีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มจาก 6.9×10^6 กรัม/โมล เป็น 8.6×10^6 กรัม/โมล ดังนั้นแซนแทนกัมที่ผลิตจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro และสูตรอาหารปรับปรุงซึ่งเลี้ยงเชื้อในระบบเขย่าและมีปริมาณออกซิเจนน้อยกว่าการผลิต KELTROL®ในระบบถังหมัก (Anonymous, 1974) จึงให้แซนแทนกัมที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและความหนืดน้อยกว่า KELTROL®

การเก็บเกี่ยวแซนแทนกัมออกจากน้ำหมักโดยการตกตะกอนด้วยเอธานอลร่วมกับเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด แต่งานวิจัยที่ทำการศึกษาถึงปริมาณเอธานอลที่เหมาะสมมีจำนวนน้อยมากทำให้ไม่ทราบว่าควรใช้เอธานอลและเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์เท่าใดจึงจะเหมาะสม ซึ่งในการผลิตแซนแทนกัมโดยทั่วไปนิยมใช้เอธานอลที่มีความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ในปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรน้ำหมักร่วมกับเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Galindo และ Albiter (1996) รายงานว่าการเพิ่มปริมาณเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์เป็นวิธีที่ช่วยลดปริมาณเอธานอลที่ต้องใช้ลงได้ โดยจากผลการทดลองพบว่าการเพิ่มปริมาตรเอธานอลที่ใช้จาก 2 เท่า เป็น 3 เท่าไม่ช่วยให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนแซนแทนกัมสูงขึ้น แสดงว่าการใช้ปริมาตรเอธานอลเท่ากับ 2 เท่าเป็นปริมาณที่มากพอที่ทำให้เกิดการตกตะกอนได้สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Sandford และคณะ (1977) และ ศศิธร โชติศศิธร (2536) ซึ่งรายงานว่าการใช้อัตราส่วนเอธานอลต่อสารละลายแซนแทนกัม 2 ต่อ 1 เท่าโดยปริมาตรให้ผลการตกตะกอนสูงสุดเช่นเดียวกัน ปกติแล้วแซนแทนกัมเมื่อละลายน้ำจะสามารถละลายและคงตัวอยู่ได้เนื่องจากแรงกระทำทางไฟฟ้าระหว่างอิออนลบบนสายแซนแทนกัมและอิออนบวกของน้ำ และเมื่อเติมเอธานอลซึ่งเป็นสาร dehydrating agent จะทำให้เกิดการรบกวนสมดุลอิออนทำให้แซนแทนกัมแยกตัวออกจากน้ำ หรือกล่าวได้ว่าเอธานอลทำให้ค่า dielectric constant ซึ่งเป็นค่าความสามารถของตัวทำละลายที่ทำให้ตัวถูกละลายละลายในตัวทำละลายนั้นๆ ของสารละลายแซนแทนกัมลดลง และนอกจากนี้เอธานอลยังช่วยเพิ่มการจับตัวของประจุบวกของเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์กับบริเวณอิออนลบของโมเลกุลแซนแทนกัม (Gonzales et al., 1989) ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณเอธานอลและปริมาณเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์มีปฏิสัมพันธ์ต่อกันทางสถิติ การใช้เอธานอลปริมาตร 2 เท่า จึงทำให้การทำงานของเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ในการจับโมเลกุลแซนแทนกัมดีกว่าการใช้เอธานอลที่มีปริมาตรเท่ากับ 1 เท่าส่งผลให้ประสิทธิภาพในการตกตะกอนสูงกว่า ส่วนการใช้เกลือ

โพแทสเซียมคลอไรด์ในปริมาณที่มากกว่าจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนสูงกว่าการใช้เกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ปริมาณน้อย รวมทั้งยังทำให้การใช้เอธานอลปริมาตร 1 เท่าร่วมกับเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการใช้เอธานอลปริมาตร 2 เท่าร่วมกับเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Gonzales และคณะ (1989) ซึ่งได้รายงานไว้ว่าในสภาวะที่สารละลายแซนแทนกัมมีความเข้มข้นของเกลือสูงจะทำให้โมเลกุลของแซนแทนกัมมีโครงสร้างแบบตติยภูมิ (tertiary structure)ในรูป weak-gel network เป็นร่างแหที่มีการจับตัวกันของสายโมเลกุลแซนแทนกัมหลายๆสายเข้าด้วยกันทำให้มีโครงสร้างตะกอนที่แข็งแรงและมีประสิทธิภาพในการตกตะกอนสูง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบสภาวะการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งด้วยกรดซัลฟิวริก พบว่าการใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์ร่วมกับการให้ความร้อนโดยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีให้ประสิทธิภาพในการย่อยกากมันสำปะหลังสูงที่สุด โดยสามารถเปลี่ยนกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 93.60 เปอร์เซ็นต์และผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 0.84 กรัม/กรัมกากมันสำปะหลังโดยให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 125.84 กรัม/ลิตร ขณะที่การใช้เอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟาอะไมเลส 0.12 ยูนิต/กรัมกากมันสำปะหลัง กลูโคอะไมเลส 9.72 ยูนิต/กรัมกากมันสำปะหลัง และเอนไซม์เซลลูเลส 15.48 ยูนิต/กรัมกากมันสำปะหลังมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 82.83 เปอร์เซ็นต์และสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 0.74 กรัม/กรัมกากมันสำปะหลังโดยให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 74.24 กรัม/ลิตร

เมื่อนำสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแซนแทนกัมจาก *X campestris* TISTR 840 พบว่าการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมสูงกว่าการใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด โดยให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการผลิตเท่ากับ 10.07 Pa $s^{0.74}$

เมื่อทำการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแซนแทนกัมโดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสูตรอาหารซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม/ลิตร กรดซิตริก 2 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียม-ซัลเฟต 0.10 กรัม/ลิตรมีประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมสูงที่สุด โดยเชื้อสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้ 92.38 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในน้ำหมักเท่ากับ 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร สามารถผลิตสารตะกอนซึ่งเป็นแซนแทนกัมที่ไม่บริสุทธิ์ได้ 0.60 กรัม/กรัมน้ำตาลรีดิวซ์ และให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักเท่ากับ 16.99 Pa $s^{0.69}$ โดยน้ำหมักมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.74 เมื่อสิ้นสุดการผลิต

เมื่อปรับปรุงวิธีการผลิตแซนแทนกัมโดยการเลี้ยงเชื้อแบบ 2 ขั้นตอนด้วยการแปรอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการกระตุ้นให้เชื้อเกิดการเจริญหรือการมีเชื้อเข้าสู่ระบบการผลิตสูงไม่ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมสูงขึ้น

เมื่อผลิตแซนแทนกัมโดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุงที่คัดเลือกได้สามารถให้ประสิทธิภาพในการผลิตสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการผลิตเท่ากับ 10.07 Pa $s^{0.74}$ แต่การผลิตแซนแทนกัมโดยเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุงนี้มีประสิทธิภาพในการผลิตต่ำกว่าการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งสามารถผลิตแซนแทนกัมได้ 9.26 กรัม/ลิตรและให้ค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักเท่ากับ 20.50 Pa $s^{0.70}$ เมื่อสิ้นสุดการผลิต

แซนแทนกัมที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุงและจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro มีคุณสมบัติในการคงตัวของความหนืดเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายใกล้เคียงกับแซนแทนกัม KELTROL®ซึ่งเป็นแซนแทนกัมเกรดอาหาร โดย KELTROL®ให้ค่าดัชนีความหนืดประมาณ 2.50 Pa $s^{0.50}$ ขณะที่แซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro และสูตรอาหารปรับปรุงให้ค่าดัชนีความหนืดประมาณ 0.70 Pa $s^{0.60}$ และ 0.20 Pa $s^{0.70}$ ตามลำดับ

เมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนแซนแทนกัมโดยใช้สารละลาย KELTROL®ในการทดลอง พบว่าปริมาตรเอธานอลและปริมาณเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการตกตะกอนมีอิทธิพลต่อกัน การใช้เอธานอลปริมาตร 2 เท่าของสารละลายแซนแทนกัมร่วมกับเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีความเหมาะสมในการตกตะกอนแซนแทนกัมมากที่สุดโดยให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนเท่ากับ 79.17 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาไทย

กรมวิชาการเกษตร. 2526. เอกสารวิชาการเล่มที่ 7: มันสำปะหลัง. กรุงเทพมหานคร: กรมวิชาการเกษตร.

กล้าณรงค์ ศรีรอต. 2538. ความรู้เบื้องต้นในการผลิตกลูโคสซีรัปจากแป้งและกากมันสำปะหลัง. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิรวรรณ อภิรักษากร. 2540. การผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จิราภรณ์ โล่ห์วงศ์วัฒน. 2525. การผลิตกรดซิตริกจากกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชิดพงศ์ ประดิษฐสุวรรณ, สุเมธ ตันตระเธียร และโปรดปราน สิริธีรศาสน์. 2540. ภาวะของอัลทราฟิลเทรชันต่อการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากกากมันสำปะหลัง. รายงานการวิจัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ฌาลิศา ยุวอมรพิทักษ์ และรำไพ เกณฑ์สาคู. 2537. การผลิตแซนแทนกัมโดย *Xanthomonas campestris*. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตมหาสารคาม.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหารตอนที่ 1. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาวินี โลหะนะ. 2524. การผลิตและการใช้ประโยชน์ของแซนแทนกัม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มนตรี จุฬาวัฒนทล. 2530. ชีวเคมี. กรุงเพมหานคร: มหาวิทยาลัยมหิดล.

มหาวิทยาลัยขอนแก่น. คณะวิทยาศาสตร์. 2536. เอกสารประกอบวิชาชีวเคมี. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทย. 2540. รายงานประจำปี 2540. กรุงเทพมหานคร: สมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทย.

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

สินีนาถ เจียมอนุกูลกิจ. 2539. การผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* NN-39 จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุดจิตต์ พรหมจิตติพงศ์ และเอื่ยมอนงค์ เชิงชัยชนะวงษ์. 2537. การศึกษาสมบัติบางประการของ Maltodextrin ที่มีค่า DE ต่ำจากแป้งมันสำปะหลัง. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุวัฒน์ ลิ้มสุวรรณ. 2534. อุตสาหกรรมกลูโคสซีรัป. เอกสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 125: 31-33.

ศศิธร โชติศศิธร. 2536. การผลิตแซนแทนกัมด้วยเครื่องชีวปฏิกรณ์แบบฟองอากาศจากสายพันธุ์คัดเลือก *Xanthomonas campestris*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรพร เต็มวาณิชย์. 2525. การผลิตแป้งและน้ำตาลเหลวจากข้าวโพดที่ปลูกในประเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรพิน ภูมิภมร. 2526. ระบบชีวภาพที่สำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพ เล่มที่ 1: จุลินทรีย์ที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมการเกษตรสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Abe, I. J.; Onitsuka, N.; Nakano, T.; Shibata, Y.; Hizukuri, S.; and Entani, E. 1994. Purification and Characterization of periplasmic α-amylase from *Xanthomonas campestris* K-11151. J. Bacteriol. 176 (12): 3584-3588.

Albiter, V.; Torres, L. G.; and Galindo, E. 1994. Rocovery of xathan from fermentation broths by precipitation in a stirred tank. Process Biochem. 29: 187-196.

Anonymous. 1974. Xanthan gum offers versatility, safty. Food Technol. 28 (6): 10-21.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Official Method of Analysis. Verginia: The Association of Official Agricultural Chemists.

Betz, D. A. 1979. Xanthan gum : A biosynthetic polysaccharide for the food industry. Food. Technol. in Aus. 131 (1): 11-16.

Cadmus, M. C.; Rogovin, S. P.; Burton, K. A.; Pittsley, J. E.; Knutson, C. A.; and Allene, J. 1976. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. Can. J. Microbiol. 22: 942-948.

Chin, H. S., and Shang, T. Y. 1990. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. Biotechnol. Bioeng. 35: 454-468.

Davidson, L. R. 1980. Handbook of Water – Soluble Gums and Resins. New York: McGraw-Hill.

Flores, F.; Torres, G. L.; and Galindo, E. 1994. Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *X. campestris* on the production and quality of xanthan gum. J. Biotechnol. 34: 165-173.

Forgarty, M. 1983. Microbial Enzyme and Biotechnology. New York: Applied Science.

Galindo, E., and Albiter, V. 1996. High yield recovery of xanthan by precipitation with isopropyl alcohol in a stirred tank. Biotechnol. Prog. 12: 540-547.

Galindo, E.; Salcedo, G.; and Ramirez, M. E. 1994. Preservation of *Xanthomonas campestris*. on agar slops : effects on xanthan production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 634-637.

Gamini, A., and Mandel, M. 1994. Physiochemical properties of aqueous xanthan solutions : static light scattering. Biopolymers. 34 (6): 783.

Garcia, F. O.; Santos, V. E.; and Fritsch, A. P. 1992. Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. Enz. Microb. Technol. 14; 991-996.

Gonzales, R.; Johns, M. R.; Greenfield, P. F.; and Pace, G. W. 1989. Xanthan gum precipitation using ethanol. Process. Biochem. 24: 200-203.

Harding, E. N.; Cleary, M. J.; and Ielpi, L. 1995. Genetics and Biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In Hui, Y. H., and George, G.K. (eds.), Food Biotechnology : Microorganisms. , pp. 495-514. New York: VCH.

Hitoshi, F.; Toshiomi, Y.; and Hisaharu, T. 1987. Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. J. Ferment. Technol. 65(5): 603-606.

Ielpi, L.; Couso, O. R.; and Dankert, A. M. 1993. Sequential assembly and polymerization of the polyprenol linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. J. Bacteriol. 175 (9): 2490-2500.

Jacob, B. M.; and Gerstein, J. M. 1960. Handbook of Microbiology. New York: D. Van Nostrand.

Jana, K. A., and Ghosh, P. 1995. Xanthan biosynthesis in continuous culture : Citric acid as an energy source. J. Ferm. Bioeng. 80 (5): 485-491.

Kang, K. S., and Cottrell, I. W. 1979. Xanthan gum. In Peppler, H. J., and Perlman, D. (eds.), Microbial Technology. pp. 443-466. New York: Academic Press.

Kennedy, J. F., and Bradshaw, I. J. 1984. Production properties and application of xanthan. Progress in Ind. Microbiol. 19: 319-371.

Kovacs, P. 1973. Xanthan gum, a new and unique colloidal stabilizer for the British food industry. Food Trade Review. 43 (11): 17-22.

Leigh, J. A., and Coplin. 1992. Exopolysaccharides in plant bacterial interactions. Annu. Rev. Microbiol. 46: 307-346.

Lilly, V. G.; Wilson, H. A.; and Leach, J. E. 1958. Bacterial polysaccharide Part II Laboratory scale production of polysaccharide by species of *Xanthomonas*. Appl. Microbiol. 6 : 105-108.

Lo, Y. M.; Yang, S. T.; and Min, D. B. 1997. Effects of yeast and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47 (6): 689-694.

Moraine, R. A., and Rogovin, P. 1966. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. Biotechnol. Bioeng. 8: 511-524.

McNeely, W. H. 1969. Process for producing a polysaccharide. U. S. patent. 3,427,226.

Milas, M.; Rinando, M.; and Tinland, B. 1985. The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. Polymer Bulletin. 14:157-164.

Molina, O.; Fitzsimons, R.; and Perotti, N. 1993. Effect of corn steep liquor on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. Biotechnol. Lett. 15 (5): 495.

Peters, U. H.; Herbst, H.; Hesselink, G. M.; Lunsdorf, H,; Schhumpe, A.; and Deckwer, D. W. 1989. The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. Biotechnol. Bioeng. 34: 1393-1397.

Pettitt, D. J. 1979. Xanthan gum. In Blanshard, J. M. V., and Mitchell, J. R. (eds.), Polysaccharide in Food. pp. 263-282. London: Butterworths.

Pinches, A., and Pallent, J. L. 1986. Rate and yield relationships in the producion of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. Biotechnol. Bioeng. 28: 1484-1496.

Rocks, J. K. 1971. Xanthan gum. Food. Technol. 25: 476-485.

Rodriguez, H., and Aguilar, L. 1997. Detection of *Xanthomonas campestris* mutants with increased xanthan production. J. Ind. Microbiol. 18: 232-234.

Roseiro, J. C.; Esgalhado, M. E.; Collaco, M. T.; and Emery, A. N. 1992. Medium development for xanthan production. Process Biochem. 27: 167-175.

Roseiro, J. C.; Girio, M. F.; Kara, A.; and Collaco, M. T. 1993. Kinetic and metabolic effects of nitrogen, magnesium and sulphur restriction in *Xanthomonas campestris* batch cultures. J. Appl. Bacteriol. 75: 381-386.

Rogovin, S. P.; Albrecht, W.; and Sohns, V. 1965. Production of industrial grade polysaccharide B-1459. Biotechnol. Bioeng. 7: 161-169.

Rogovin, S. P.; Anderson, R. F.; and Cadmus, M. C. 1961. Production of polysaccharide with *Xanthomonas campestris*. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 3 (1): 51-63.

Salam, M. H.; Fadel, M. A.; and Murad, H. A. 1994. Bioconversion of sugarcane molasses into xanthan gum. J. Biotechnol. 33: 103-106.

Sandford, P. A.; Pittsley, J. E.; Knutson, C. A.; Watson, P. R.; Cadmus, M. C.; and Jeanes, A. 1977. Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: Characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. In Sandford, P. A., and Laskin, A. (eds.), Extracellular Microbial Polysaccharides., pp. 195-209. Washington: American Chemical Society.

Slodki, M. E., and Cadmus, M. C. 1978. Production of microbial polysaccharides. Adv. Appl. Microbiol. 23: 19-26.

Smith, I. H.; Symes, K. C.; and Lawson, C. J. 1981. Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. Int. J. Biol. Macromol. 3: 129-134.

Souw, P., and Demain, L. A. 1979. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Appl. Environ. Microbiol. 37 (6): 1186-1192.

Torres, G. L.; Brito, E.; Galindo, E.; and Choplin, L. 1993. Viscous behaviour of xanthan aqueous solutions from a variant strain of *Xanthomonas campestris*. J. Ferm. Bioeng. 75 (1): 58-64.

Tewari, K. H., and Marwaha, S. S. 1988. Evaluation of acid and cellulase enzyme for the effective hydrolysis of agricultural lignocellulosic residues. J. Chem. Tech. Biotechnol. 41: 261-275.

Tsao, G. T., and Chou, T. Y. 1981. Process for recovering and utilizing cellulose using sulfuric acid. U. S. patent. 4,266,981.

Vuyst, D. L.; Loo, V. J.; and Vandamme, J. E. 1987. Two step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. J. Chem. Tech. Biotechnol. 39: 263-273.

Vuyst, D. L., and Vermeire, A. 1994. Use of industrial medium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 187-191.

Weber, R. O., and Horan, F. E. 1966. Biochemical synthesis of industrial gums. U. S. patent. 3,271,267.

Weiss, M. R., and Ollis, F. D. 1980. Extracellular microbial polysaccharides I : Substrate, biomass and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation. Biotechnol. Bioeng. 22: 859-873.

Whistler, R. O., and Bemiller, J. N. 1973. Industrial gums. New York: Academic Press.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งสูตร Yeast Malt extract สำหรับเก็บรักษาเชื้อ

กลูโคส	10	กรัม
ยีสต์สกัด	3	กรัม
มอลต์สกัด	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้นผง	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ± 0.2

2. อาหารเหลวสูตร Yeast Malt extract สำหรับเตรียมหัวเชื้อ

กลูโคส	10	กรัม
ยีสต์สกัด	3	กรัม
มอลต์สกัด	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ± 0.2

3. อาหารเหลวสูตร Roseiro (Roseiro et al., 1992)

กลูโคส	30	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	3.33	กรัม
กรดบอริก	0.0072	กรัม
เฟอริกคลอไรด์	0.0042	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	7.2	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	0.029	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.24	กรัม
ซิงค์ออกไซด์	0.006	กรัม
กรดซิตริก	2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ± 0.2

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

1.1 ปริมาณโปรตีน

1.1.1 ชั่งกากมันสำปะหลัง 2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

1.1.2 ใส่ antibumping beads ลงไป 2-3 เม็ด เติมคะตะลิสต์ 1 กรัม (โพแทสเซียมซัลเฟต 10 กรัม + คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม)

1.1.3 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 4 มิลลิลิตร ย่อยประมาณ 2-3 ชั่วโมง จนตัวอย่างใส เป็นสีเหลืองอ่อน หรือ ไม่มีสี

1.1.4 ทิ้งให้เย็น แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

1.1.5 ทำการกลั่น โดยต่อ Kjeldahl flask เข้ากับเครื่อง Vapodest รองรับสารที่กลั่นได้ด้วยกรดบอริก เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร ซึ่งเติมเมทธิลโบรโมครีซอลกรีนอินดิเคเตอร์ (สารละลายเมธิลเรด และสารละลายโบรโมครีซอลกรีนในแอลกอฮอล์ เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 : 5) 3-4 หยด

1.1.6 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร ลงใน Kjeldahl flask กลั่นจนขวดรองรับมีสารละลาย 250 มิลลิลิตร

1.1.7 นำสารละลายที่กลั่นได้ในขวดรองรับ ไตเตรทด้วยกรดซัลฟิวริก เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีแดง

1.1.8 คำนวณปริมาณไนโตรเจนและปริมาณโปรตีน

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน} = \frac{\text{กรดซัลฟิวริกที่ใช้ไตรเตรท(มล.)} \times 0.1 \times 14}{\text{น้ำหนักกากมันสำปะหลัง (กรัม)} \times 10}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)} = \text{ปริมาณไนโตรเจน} \times 6.25$$

1.2 ปริมาณความชื้น

1.2.1 ชั่งกากมันสำปะหลัง 2-5 กรัม ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมซึ่งแห้ง และทราบน้ำหนัก

1.2.2 นำเข้าอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

1.2.3 ทิ้งให้เย็นใน desiccator

1.2.4 ชั่งน้ำหนัก และคำนวณความชื้นจาก

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนอบ(กรัม)} - \text{น้ำหนักหลังอบ(กรัม)}}{\text{น้ำหนักก่อนอบ(กรัม)}}$$

1.3 ไขมัน

1.3.1 ชั่งกากมันที่ผ่านการอบแล้ว 2 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1

1.3.2 ใส่ใน Thimble สกัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์

1.3.3 ใช้เวลาสกัดไขมัน 6-8 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำมันที่สกัดได้ไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

1.3.4 ทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนัก และคำนวณปริมาณไขมันจาก

$$\text{ปริมาณไขมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันที่สกัดได้ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักกากมันสำปะหลัง(กรัม)}}$$

1.4 ปริมาณเส้นใย

1.4.1 ชั่งกากมันสำปะหลังที่ผ่านการสกัดไขมันแล้ว 2 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร

1.4.2 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ ที่ต้มเดือด 200 มิลลิลิตร

1.4.3 ย่อยนาน 30 นาที โดยให้สารละลายเดือดตลอดเวลา

1.4.4 กรองผ่านกระดาษ Whatman No. 41

1.4.5 ล้างด้วยน้ำร้อน จนหมดฤทธิกรด

1.4.6 ทำการย่อยต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ ที่ต้มเดือด 200 มิลลิลิตร

1.4.7 กรองผ่านกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแล้ว และล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดฤทธิด่าง

1.4.8 อบที่ 130 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

1.4.9 ทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนัก

$$\text{ปริมาณเส้นใย} = \frac{\text{นน.ตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)} - \text{นน.ตัวอย่างหลังอบ (กรัม)}}{\text{นน.ตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

1.5 ปริมาณเถ้า

1.5.1 ชั่งกากมันสำปะหลัง 2 กรัม ใส่ใน crucible ที่เผาและทราบน้ำหนักแล้ว

1.5.2 นำกากมันสำปะหลังไปเผาจนหมดควัน และนำเข้าเผาต่อใน muffle furnace ที่ 600 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จนได้เถ้าสีขาว

1.5.3 ทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนัก และคำนวณหาปริมาณเถ้า

$$\text{ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักหลังเผา(กรัม)}}{\text{น้ำหนักกากมันสำปะหลัง(กรัม)}} \times 100$$

1.6 ปริมาณคาร์โบไฮเดรท

ปริมาณคาร์โบไฮเดรท(เปอร์เซ็นต์) = 100 – (โปรตีน+ความชื้น+ไขมัน+เส้นใย+เถ้า)

2. การคำนวณประสิทธิภาพการย่อยกากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลัง 100 กรัม ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรท 67.463 กรัม

ไฟเบอร์ 11.577 กรัม

ดังนั้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่กากมันสำปะหลังมีได้

= (67.463+11.577) x 1.1 = 86.944 กรัม/กากมัน 100 กรัม

หากสามารถย่อยกากมันสำปะหลัง 100 กรัม ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 54.74 กรัม

ดังนั้น มีประสิทธิภาพการย่อย (54.74 / 89.63) x 100 = 62.96

3. การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNSA

สารเคมี 1. เตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 นอร์มอล

2. เตรียมสารละลาย DNSA โดยละลาย 3,5 Dinitrosalicylic acid (DNSA) 2.5 กรัม ลงใน 50 มิลลิลิตร ของ 2 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ และเติมโซเดียมโพแทสเซียมทราเทรท 75 กรัม คนจนละลาย เติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการ 1. นำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNSA 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. ต้มในน้ำเดือด 10 นาที

3. ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว แล้วเติมน้ำ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

5. คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จาก standard curve ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0-1 กรัม/ลิตร เป็นสารมาตราฐาน

4. วิธีวัดปริมาณสารตะกอนในน้ำหมัก

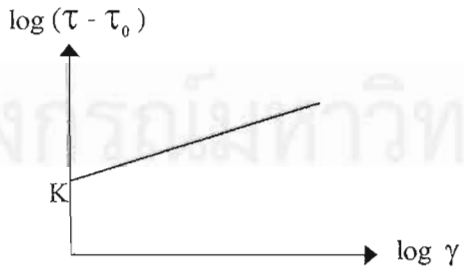
นำน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ที่ชั่วโมงการเลี้ยงต่างๆ ปั่นแยกเซลล์ออก ที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบ/นาที นาน 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ตกตะกอนสารพอลิแซคคาไรด์ โดยใช้ปริมาตรเอธานอลต่อน้ำหมัก 3 : 1 ร่วมกับ โพแทสเซียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) นำสารตะกอนที่ได้อบแห้ง ที่ 60 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำเข้า desiccator 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงชั่งน้ำหนัก

5. การคำนวณค่าดรรชนีความหนืด (viscosity index : K)

นำน้ำหมัก ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ วัดความหนืด โดยการแปรอัตราการเฉือน(γ) จดบันทึกค่าความเค้นเฉือน(τ) นำค่าความเค้นเฉือน และอัตราการเฉือน เขียนกราฟความสัมพันธ์

$$\tau = \tau_0 + K\gamma^n$$

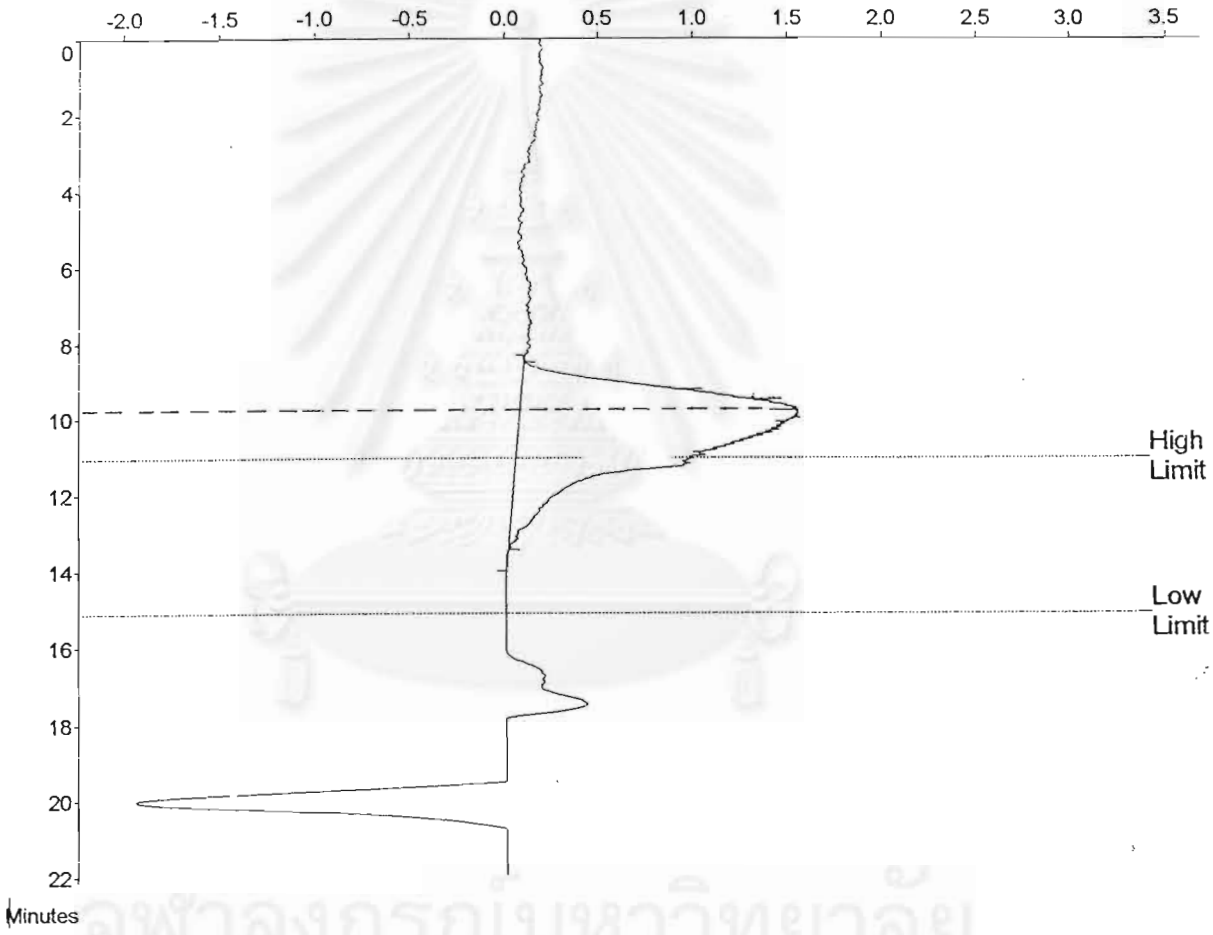
$$\log(\tau - \tau_0) = \log K + n \log \gamma$$



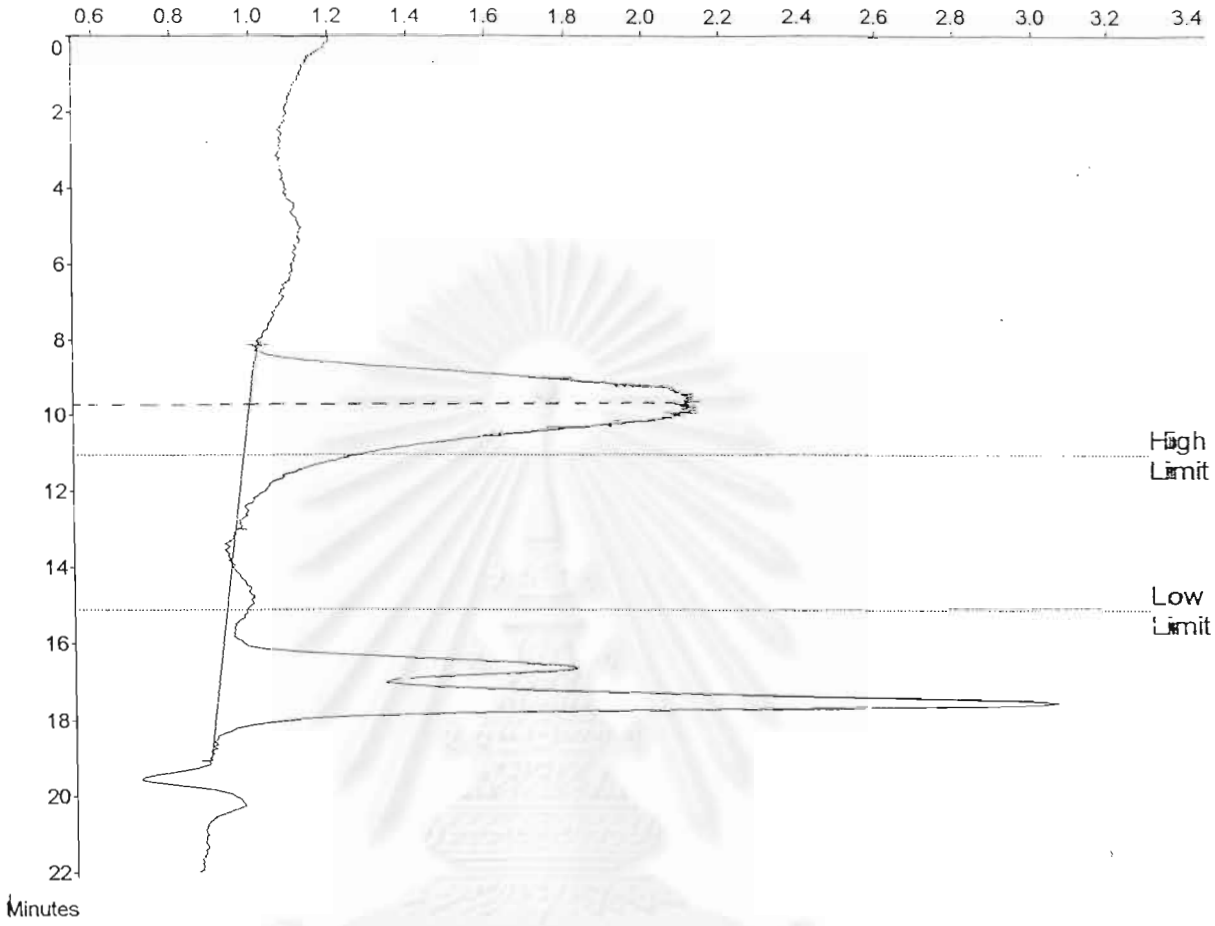
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของแซนแทนกัมด้วย Gel Permeation Chromatrography

นำสารละลายแซนแทนกัมเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.4 ไมครอน จากนั้นนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยด้วย Gel Permeation Chromatrography โดยใช้คอลัมน์ชนิด Linear Ultrahydrogel ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์เป็นสารละลายตัวพาโดยใช้อัตราเร็ว 0.6 มิลลิลิตร/นาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการตรวจวัดด้วยคลื่นแสงอินฟราเรดโดยใช้สารพลูลูแลนเป็นสารมาตราฐาน (ทำการวิเคราะห์โดยศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ)

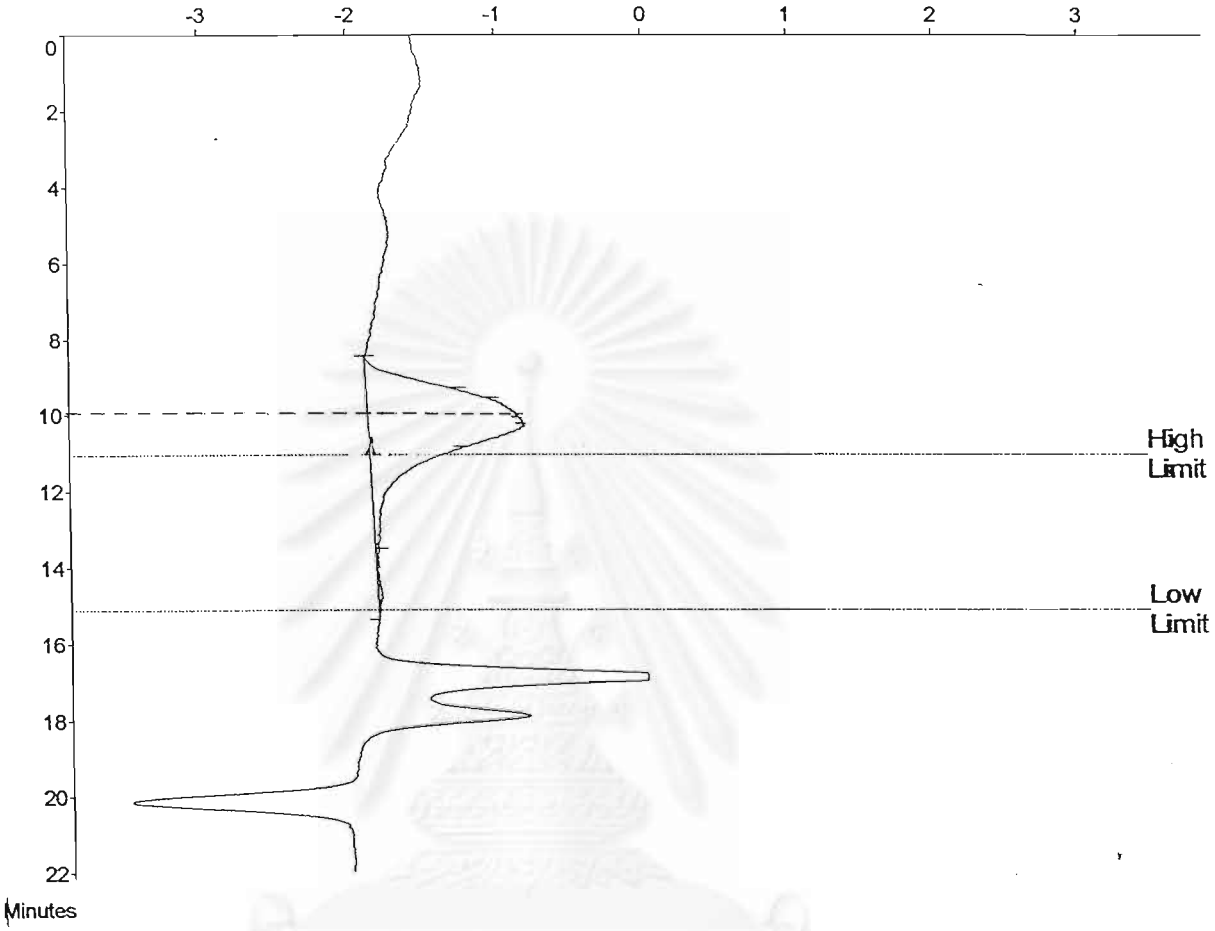


รูปที่ 20 ก กราฟการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ KELTROL ด้วย Gel Permeation Chromatrography



รูปที่ 20 ข กราฟการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแซนแทนกัมที่ผลิตจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารของ Roseiro ด้วย Gel Permeation Chromatrography

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 ค กราฟการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแซนแทนกัมที่ผลิตจากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารปรับปรุง ด้วย Gel Permeation Chromatrography

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ค 1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของประสิทธิภาพการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design

		Experimental Method				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Main Effects	(Combined)	2349.466	6	391.578	59.068	.000
	CONC.	990.794	2	495.397	74.729	.000
	TEMP	936.118	2	468.059	70.605	.000
	TIME	422.554	2	211.277	31.870	.000
2-Way Interactions	(Combined)	2079.778	12	173.315	26.144	.000
	CONC.*TEMP	806.788	4	201.697	30.425	.000
	CONC.*TIME	681.457	4	170.364	25.699	.000
	TEMP*TIME	591.534	4	147.883	22.308	.000
3-Way Interactions	CONC.*TEMP* TIME	336.886	8	42.111	6.352	.000
Model		4766.131	26	183.313	27.652	.000
Residual		178.990	27	6.629		
Total		4945.120	53	93.304		

กำหนดให้ CONC. แทน ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก

TEMP แทน อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย

TIME แทน เวลาที่ใช้ในการย่อย

ตารางที่ ค 2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่มีการแปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต, กรดซิตริก และแมกนีเซียมซัลเฟต โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design

		Experimental Method				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Main Effects	(Combined)	1092.510	6	182.085	1727.027	.000
	NITROGEN	218.393	2	109.196	1035.697	.000
	CITRIC	840.344	2	420.172	3985.219	.000
	MG	33.773	2	16.887	160.166	.000
2-Way Interactions	(Combined)	107.260	12	8.938	84.777	.000
	NITROGEN * CITRIC	21.643	4	5.411	51.320	.000
	NITROGEN * MG	28.622	4	7.155	67.867	.000
	CITRIC * MG	56.995	4	14.249	135.145	.000
3-Way Interactions	NITROGEN * CITRIC * MG	54.653	8	6.832	64.797	.000
Model		1254.423	26	48.247	457.610	.000
Residual		5.693	54	.105		
Total		1260.117	80	15.751		

กำหนดให้ NITROGEN แทน แอมโมเนียมซัลเฟต

CITRIC แทน กรดซิตริก

MG แทน แมกนีเซียมซัลเฟต

ตารางที่ ค 3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ และกรดเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	385.602	1	385.602	1338.585	.000
Within Groups	1.152	4	.288		
Total	386.754	5			

ตารางที่ ค 4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของจำนวนเซลล์มีชีวิต ในการแปรระดับความเข้มข้น ของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.0×10^{17}	4	1.7×10^{17}	49.934	.000
Within Groups	1.8×10^{16}	5	3.5×10^{15}		
Total	7.2×10^{17}	9			

ตารางที่ ค 5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของค่าดัชนีความหนืดของน้ำหมักเมื่อมีการผลิตแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียวและ 2 ขั้นตอน โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.924×10^{-2}	3	2.641×10^{-2}	.385	.767
Within Groups	.549	8	6.856×10^{-2}		
Total	.628	11			

ตารางที่ ค 6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของประสิทธิภาพการตกตะกอนแซนแทนกัม เมื่อมีการแปรปริมาตรเอธานอลและปริมาณโพแทสเซียมคลอไรด์ โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design

		Experimental Method				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Main Effects	(Combined)	3628.080	4	907.020	277.740	.000
	ETOH	1268.890	2	634.445	194.274	.000
	SALT	2359.189	2	1179.595	361.205	.000
2-Way Interactions	ETOH * SALT	101.186	4	25.297	7.746	.001
Model		3729.266	8	466.158	142.743	.000
Residual		58.783	18	3.266		
Total		3788.049	26	145.694		

ประวัติผู้เขียน

นางสาวธันยาภรณ์ นาวินวรรณ เกิดเมื่อวันที่ 13 กรกฎาคม พ.ศ. 2518 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคราม เมื่อปีการศึกษา 2538 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิตในหลักสูตรสหสาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย