บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยหลักของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ แบ่งออกเป็น 3 ส่วนใหญ่ๆคือ การคัดเลือกเชื้อ *Xanthomonas compestris* ที่ได้รับจาก NRRL แล้วหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มการเจริญและผลผลิตแซนแทน กัม ในระดับขวดเขย่าตลอดจนวิธีการตกตะกอนกัม หลังจากนั้นนำสภาวะที่ศึกษาได้แล้วไปขยายขนาดการผลิตสู่ถังชีวปฏิกรณ์ขนาด 2.5 ลิตร

4.1 การจำแนกลักษณะและคัดเลือกเชื้อและหาสภาวะที่เหมาะสมกับการผลิตแซนแทนกัม

มีงานวิจัยมากมายที่พบถึงความไม่เสถียรของเชื้อ *X. campestris* และมีการพบสายพันธุ์ที่มีลักษณะแตกต่างไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ NRRL-B 1459 (Cadmus และคณะ, 1971; Cadmus และคณะ, 1976; Sandford และคณะ 1977) Cadmus และคณะ (1976) รายงานถึงการเก็บ *X. campestris* ในอาหารแข็ง YM และ TGY และทำการถ่ายเชื้อ ทุกอาทิตย์ หลังจาก 12-18 เดือน เชื้อ *X. campestris* ผลิตโพลีแซคคาไรด์ได้ในปริมาณที่ต่ำมาก เมื่อนำมา steak ดูจะพบโคโลนีที่มีขนาดและสีต่างกัน โคโลนีขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 4-5 มม.) มีสีเหลืองอ่อน เป็นเมือก โคโลนีขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.) มีสีเหลืองเข้มเป็นเมือก และพบโคโลนีขนาดเล็กมาก (เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.) ไม่เป็นเมือก เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตกัมของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า จุลินทรีย์ที่มีโคโลนีขนาดใหญ่ให้ความหนืดสูงกว่าจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กเกือบ 2 เท่า

Cadmus เสนอแนะว่าการแปรผันของโคโลนีอาจเกิดขึ้นได้จากขั้นตอนของการเก็บในอาหารแข็ง หรือจากขั้นตอนของการหมักแบบต่อเนื่อง ซึ่งในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงสาเหตุที่แท้จริงของการแปรผันของเชื้อ

ในการทดลองขั้นต้นของโครงการวิจัยนี้ มุ่งที่จะศึกษาและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญและให้ผลผลิตแซนแทนสูง จะเห็นได้ว่า สายพันธุ์ *X. campestris* ที่ได้จาก NRRL นั้น เมื่อนำเซลล์จาก stock ที่เก็บไว้ในรูปของไลโอฟิไลซ์ แล้วทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรผลิตแซนแทน พบว่ามีโคโลนีของ *X. campestris* อยู่ 2 ชนิด คือ โคโลนีสีขาว ซึ่งไม่ผลิตแซนแทน กับโคโลนีสีเหลือง มัน นูน ซึ่งสามารถผลิตแซนแทนได้ เมื่อนำโคโลนีสีเหลืองและมีเมือกไปเพาะเลี้ยงแล้วกระจายลงบนอาหารแข็งสูตรปกติ จะสามารถตรวจพบโคโลนีของ *X. campestris* ซึ่งให้ความหนืดแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดคือ 150, 120, 80 เซนติพอยซ์ สำหรับโคโลนีขนาดใหญ่ กลาง และ เล็ก ตามลำดับ และในขณะที่ปริมาณแซนแทนที่ติดตามค่า นน.

แห้งต่อปริมาตรมีค่า 38,28 และ 26 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สำหรับโคโลนีที่พบคาดว่าเป็นเชื้อโคโลนีที่กลายพันธุ์เนื่องจากโคโลนีไม่มีเมือก และไม่ให้โพลีแซคคาไรด์

การศึกษาเพิ่มเติมของ Cadmus และคณะ (1978) ถึงการแปรผันของสายพันธุ์ *X. campestris* พบว่า การเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่อง (batch type) และต่อเนื่อง (continuouse type) เป็นเวลานานจะมีผลต่อคุณภาพและปริมาณกัมที่ผลิตได้ สำหรับคุณภาพสามารถตรวจสอบได้จากปริมาณกรดไพรูวิกในแซนแทนกัมซึ่งควรมีปริมาณสูงด้วย

ในงานวิจัย ได้ติดตามวัดปริมาณกรดไพรูวิกของโคโลนีทั้งสามขนาด พบว่า *X. campestris* ที่คัดเลือกได้ ซึ่งได้ค่าไพรูวิกเฉลี่ยประมาณ 105, 90% และ 85 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 1.05%, 0.90% และ0.85%ตามลำดับ ปริมาณกรดไพรูวิกที่วัดได้จากการทดลองนี้มีค่าค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับระดับมาตรฐานที่ Sandford และคณะ (1977) ได้กำหนดไว้ว่าแซนแทนที่มีคุณภาพดีต้องมีปริมาณกรดไพรูวิกสูงมากกว่า 4% เรียกว่า high pyruvic xanthan แซนแทนที่มีคุณภาพต่ำกว่า 2% จัดเป็นแซนแทนคุณภาพต่ำ (low pyruvic xanthan) อาจเนื่องมาจากการแปรผันของเชื้อ แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณไพรูวิกต่อน้ำหนักแห้งของการทดลองมีค่าคงที่แสดงว่า เชื้อสามารถให้แซนแทนที่มีคุณภาพใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง

จากการทดลองถ่ายเชื้อ *X. campestris* ซึ่งมีขนาดโคโลนีใหญ่ซึ่งแยกได้อย่างต่อเนื่อง (ทุก 14 วัน) จะให้ผลสรุปยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่า การถ่ายเชื้อหลาย ๆ ครั้ง จะมีผลต่อการผลิตแซนแทนลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน เชื้อแบคทีเรียที่ถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ได้ปริมาณกัมเฉลี่ยประมาณ 32 กรัมต่อลิตร ความหนืด 450 เซนติพอยซ์ หลังจากถ่ายเชื้อจำนวน 20 ครั้ง สามารถหาปริมาณกัมได้ 22 กรัมต่อลิตร ความหนืด 380 เซนติพอยซ์ อาหารที่ใช้เก็บเชื้อเป็นอาหารสูตรอุดม ที่มีมันฝรั่งและน้ำตาลกลูโคส (ตามข้อ 2.3.1) เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน การถ่ายเชื้อทุกครั้งก็จะเลือกเฉพาะโคโลนีขนาดใหญ่เท่านั้นมาลงอาหารใหม่แม้กระนั้นก็ยังพบว่า ประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนของ *X. campestris* ที่คัดเลือกได้ลดลงตลอดเวลา ทั้งนี้อาจมีผลเนื่องมาจากการถ่ายเชื้อแต่ละครั้งซึ่งเป็นการเจือจางปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่หนาแน่นในอาหารใหม่ที่จำซึ่งมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตน้อยลงและเพิ่มปริมาณเซลล์ต่อไป ดังนั้นหากมีเชื้อผสม (mix culture) ของแบคทีเรียที่ผลิตแซนแทนสูงกับต่ำอยู่ด้วยกัน การถ่ายเชื้อแต่ละครั้งอาจเป็นการทำให้เซลล์ที่ผลิตแซนแทนต่ำมีโอกาสเจริญและเพิ่มสัดส่วนมากขึ้น จึงทำให้ประสิทธิภาพของการผลิตกัมต่ำลงตลอดเวลาทุกครั้งที่ทำการถ่ายเชื้อ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า เนื่องจากมีการแปรผันของเชื้อมีการผลิตแซนแทนต่ำสูง การถ่ายเชื้อแม้จะเลือกเฉพาะโคโลนีขนาดใหญ่มา แต่ไม่สามารถทราบได้ว่า โคโลนีนั้นมีการผลิตแซนแทนสูงขึ้นหรือไม่จนกว่าจะทำการทดลอง

จากรายงานของ Cadmus และคณะ (1976) พบว่า อัตราส่วนของโคโลนีขนาดใหญ่ต่อโคโลนีขนาดเล็กที่ได้จากการถ่ายเชื้อ 1, 2, 6 ครั้งในช่วงเวลา 14 วัน บนอาหารแข็งอุดม YM (Yeast Malt) จะมีค่า 200:1 , 120:1 , 1:1 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าจำนวนครั้งของการถ่ายเชื้อบ่อยครั้งเท่าใดในช่วง 14 วัน จะมีผลทำให้เกิดการแปรผันจากโคโลนีขนาดใหญ่เป็นเล็กสูงมากขึ้น Cadmus และคณะ (1976) พบว่าการถ่ายเชื้อในอาหารที่มีองค์ประกอบของ D-glucose มากพอที่จะไม่ถูกใช้หมดในระหว่างการถ่ายเชื้อครั้งต่อไป หรือการลดช่วงเวลาของการถ่ายเชื้อให้สั้นลง จะรักษาระดับการผลิตแซนแทนของ *Xanthomonas spp.* ได้ นอกจากนี้ยังได้ให้ข้อคิดอีกว่า การเปลี่ยนแปลงการผลิตแซนแทน นอกจากมองในแง่ปริมาณแล้ว คุณภาพของแซนแทนที่ได้ก็อาจเปลี่ยนไปด้วย

ในการวิจัยนี้เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์ให้ได้โคโลนีขนาดใหญ่ จากสายพันธุ์ของ NRRL แล้ว ได้ทำการเก็บเชื้อไว้ 2 แบบ คือ การนำไปทำแห้งขณะแช่แข็ง (lyophilize) และเก็บในพาราฟินเหลว (liquid parafin) ที่อุณหภูมิ 4°ซ และอีกแบบคือเก็บบนอาหารสูตรอุดมที่มีซูโครสและมันฝรั่งมากพอ เทพาราฟินราดทับแล้วไว้ที่ -20°ซ หรือ 4°ซ เพื่อใช้เป็น master plate และทุกครั้งที่ทำการทดลองจะใช้เซลล์ขวดใหม่เสมอ

4.2 <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญและการผลิตแซนแทน</u>

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแซนแทน พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 30°ซ หรือรองลงมาที่ 28°ซ ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 30°ซ (32 และ 35 °ซ) การเจริญและการผลิตกัมจะลดลงทันที แสดงว่าอุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมมาก Pinches และ Palent (1985) เสนอว่า อุณหภูมิ 30°ซ เหมาะสำหรับการผลิตแซนแทนกัม Cadmers และคณะ (1985) พบว่า อุณหภูมิ 30°ซ เหมาะสำหรับการเจริญของเซลล์และการสร้างแซนแทนกัม แต่ทำให้มีปริมาณกรดไพรูวิกลดลง แต่ที่อุณหภูมิ 20°ซ เซลล์ถึงมีการเจริญและสร้างแซนแทนต่ำแต่ให้ปริมาณกรดไพรูวิกสูง Milas และคณะ (1989) ได้เลี้ยง *X. campestris* ในถังหมัก 300 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30°ซ สามารถผลิตกัมได้สูงเช่นเดียวกัน

สำหรับผลกระทบของการให้อากาศโดยการเขย่าต่อการเจริญของ *X.campestris* ในงานวิจัยนี้พบว่า เมื่อแปรผันความเร็วรอบของการเขย่า โดยใช้เครื่อง Psychotherm อัตราเร็วต่าง ๆ มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ค่าความหนืดที่ได้จากการเขย่าที่ 250 รอบต่อชั่วโมง มีค่าสูงสุดถึง 900 เซนติพอยซ์ ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากการเขย่าด้วยความแรงที่เหมาะสม ทำ

ให้เกิดการแพร่ในอาหารอากาศในอาหารได้ดี อัตราการกวนต่ำจะทำให้มีการจำกัด ของการละลายของออกซิเจน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีผลทำให้ ทั้งคุณภาพและปริมาณแซนแทนต่ำลงเนื่องจาก เซลล์จะปล่อยเมือก (slime layer) ออกมาภายนอกเซลล์ จึงเป็นสาเหตุให้ออกซิเจนในอาหารถูกจำกัด นอกจากนี้ การเขย่าด้วยอัตราความเร็วต่ำ จะมีผลทำให้การผสมของสารละลายที่มีความหนืดสูงเข้ากันได้ไม่ดีหรือไม่เข้ากัน อาจมีจุลินทรีย์บางส่วนที่อยู่ในจุดอับ(stagment zone) เป็นเวลานานไม่สามารถผลิตแซนแทนได้ดี จึงทำให้ผลผลิตของกัมน้อยลงด้วย โดยปกติการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า จะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของออกซิเจนในอาหารน้อย แม้จะเพิ่มอัตรากวนขึ้นก็ตาม Petero และคณะ (1989) ได้ศึกษาอัตราการเขย่าต่อการเจริญ และการผลิตกัมของ *X. campestris* พบว่าการเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200-800 รอบต่อนาที จะไม่มีผลทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งแตกต่างกันมาก ยกเว้นที่ 200 รอบต่อนาที จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำสุด เพราะว่า มีปริมาณออกซิเจนจำกัดทำให้จำกัดการเจริญไปด้วย สำหรับการสร้างแซนแทน พบว่าที่ความเร็วการเขย่า 200 รอบต่อนาที ก็ให้ความหนืดต่ำ แต่เมื่อเพิ่มเป็น 400 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณกัมในปริมาณที่ใกล้เคียงกับความเร็ว 800 รอบต่อนาที

ในการศึกษาเปรียบเทียบแหล่งต้นคาร์บอนที่เหมาะสม ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* ในอาหารที่มีซูโครสและกลูโคสเป็นแหล่งต้นคาร์บอนที่ปริมาณ 2.25% เท่ากัน พบว่า กลูโคสสามารถให้การเจริญได้ดีกว่า รวมทั้งให้ปริมาณกัมและเป็นน้ำหนักที่สูงกว่า 2 เท่า และ 2.5 เท่าตามลำดับ เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ที่เซลล์สามารถใช้ประโยชน์ได้ทันที ในขณะที่ซูโครสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ซึ่ง *X. campestris* อาจต้องมีการย่อยก่อนด้วยเอนไซม์ invertase ก่อนนำไปใช้ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกกลูโคสเป็นแหล่งต้นคาร์บอนที่นิยมใช้เพื่อผลิตแซนแทน สำหรับปริมาณของกลูโคสที่ได้ศึกษาคือ 3% เป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญ มีผลทำให้ความหนืด , ปริมาณกัม และกรดไพรูวิกสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น จากการทดลองถ้าเพิ่มปริมาณน้ำตาลให้มากเกินพอกับความต้องการ (4-5%) จะมีผลทำให้ยับยั้งการเจริญและการสร้างแซนแทนบางส่วนด้วยเช่นกัน Rogovin และคณะ (1965) ได้รายงานถึงการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 3% เป็นเวลา 96 ชม. พบว่า น้ำตาลกลูโคส 50% เท่านั้นที่ถูกเปลี่ยนเป็นแซนแทน แต่ถ้าใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงกว่านี้ก็จะไม่มีประสิทธิภาพในการผลิตกัมให้สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากความหนืดที่เกิดขึ้นในสภาวะการหมักจะมีค่าสูงมีผลทำให้อากาศไม่สามารถกระจายได้อย่างทั่วถึง

Souw และ Demain (1979) รายงานว่า *X. campestris* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส และซูโครสเป็นแหล่งต้นคาร์บอนที่ดีที่สุดต่อการผลิตแซนแทน และพบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสมากเกินพอจะไม่มีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตแซนแทนเลย แต่ถ้าเติมน้ำตาลฟรุกโตส

หรือไซโลส มากเกินพอในอาหารที่มี 2% กลูโคสอยู่ด้วย จะทำให้มีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างแซนแทนได้

Kenedy และ Bradshow (1984) รายงานว่า ที่ความเข้มข้น 1-5% กลูโคสสามารถให้ผลผลิตกัมที่ดีที่สุด ส่วนในการทดลองของ Cadmus และคณะ (1983) พบว่า การใช้กลูโคส 2.5% เป็นปริมาณที่เหมาะสมกับการเจริญและการผลิตกัมของ *X. campestris*

McNeely (1987a) รายงานว่า แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนที่ดีในการเจริญและการผลิตของ *X. campestris* และควรใส่ในปริมาณที่เหมาะสมถ้าใช้เป็นปริมาณมากเกินไปจะเป็นพิษต่อเซลล์ทำให้การเจริญและการผลิตแซนแทนลดลง ในทำนองเดียวกันกับการใส่ในปริมาณที่น้อยเกินไป ซึ่งไม่เพียงพอต่อการเจริญของเซลล์ ในงานวิจัยใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน และจากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมคือใช้แอมโมเนียมไนเตรตที่ความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซนต์ ซึ่งถ้าใช้ต่ำกว่านี้ พบว่ามีการเจริญและผลิตแซนแทนต่ำแต่ถ้าใช้สูงกว่านี้คือ 0.1 เปอร์เซนต์ จะทำให้แบคทีเรียมีการเจริญดีแต่ผลผลิตแซนแทนต่ำกว่า 0.08 เปอร์เซนต์ Souw และ Demain (1979) พบว่าแหล่งของไนโตรเจนต่างๆ เช่น กรดอะมิโนต่างๆ (อะลานีน, ทรีโอนีน, แอสพาราจีน, กลูตาเมต,โปรลีน, ไฮดรอกซีโปรลีน) ตลอดจนเกลือไนเตรต (แอมโมเนียมไนเตรต, โซเดียมไนเตรต) เป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ดีสำหรับการผลิตแซนแทนมากกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต และการให้ปริมาณไนโตรเจนมากเกินไปจะมีผลไปกระตุ้นการเจริญของเซลล์แต่ทำให้การผลิตแซนแทนลดลง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า ปริมาณการผลิตแซนแทนที่ดีสูงที่สุด จำเป็นต้องอยู่ภายใต้สภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับ Goto และคณะ (1973) เสนอว่ากรดอะมิโนจำพวกกลูตามิก, ฮีสติดีน, และ ลูซีน เหมาะสำหรับการผลิตโพลีแซคคาไรด์ของ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดีเช่นกัน

โครงงานวิจัยนี้ได้ทดสอบความต้องการของสารอาหารแหล่งต้นตอฟอสเฟต โดยใช้สารอาหารฟอสเฟตในรูปของไดโปแตสเซียมฟฟอสเฟต ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ที่ใช้ได้เหมาะสมคือ 0.4 เปอร์เซนต์ (23 มิลลิโมลาร์)ซึ่งให้ผลการใกล้เคียงกับเมื่อใช้สารชนิดเดียวกัน ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซนต์ และ 0.9 เปอร์เซนต์ แต่จะมีการให้ผลผลิตแซนแทนสูงสุดต่อเมื่อใช้ความเข้มข้น 0.4% ซึ่งฟอสเฟตที่ใช้จะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากปฏิกิริยาการผลิตแซนแทนจะมีการผลิตกรดไพรูวิกและอะซิตกออกมาด้วย Moraine และ Rogovin (1979a) ได้พบว่า การผลิตแซนแทนกัมจะสูงขึ้นได้ถ้าควบคุม pH ให้อยู่ประมาณ 7 โดย *X. campestris* สามารถผลิตกัมได้สูงกว่า การไม่ได้ควบคุมถึง 2 เท่า แต่ต้องใช้ความ

เข้มข้นของกลูโคสสูงเพิ่มขึ้นจาก 2-3 % ไปเป็น 5% นอกจากนี้ปริมาณฟอสเฟตยังจำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์อีกด้วย

การทดลองหาปริมาณแมกนีเซียมที่เหมาะสม โดยการแปรผันตั้งแต่ 0.005ถึง0.025% การทดลองแสดงว่า การเติมแมกนีเซียมในปริมาณที่มากเกินไป อาจจะไปมีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างแซนแทนได้มากกว่าการเติมในปริมาณน้อย ๆ แมกนีเซียมเป็นเกลือแร่ที่จำเป็นต่อการเจริญและการสร้างแซนแทน โดยการเติมเพียงจำนวนเล็กน้อย 0.01% ก็เหมาะและเพียงพอสำหรับการเจริญและการสร้างแซนแทนได้

เมื่อได้สภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับการเจริญและผลิตแซนแทนกัมแล้ว จึงได้นำสภาวะต่าง ๆ มาใช้เพาะเลี้ยง *X. campestris* ที่คัดเลือกได้ โดยเปรียบเทียบกับสภาวะของอาหารเพาะเลี้ยงที่ยังไม่ได้ปรับปรุง ผลการทดลองจะเห็นได้ว่า อาหารสูตรปรับปรุงใหม่และสภาวะที่หาได้ใหม่จะให้ค่าการเจริญสูงกว่าสูตรดั้งเดิม (A_{650} และน้ำหนักเซลล์แห้ง) ประมาณ 25% มีการลดลงของ pH ในอาหารเลี้ยงด้วยอัตราเร็วสูงกว่าและ pH ลดลงมากกว่า ในขณะที่อัตราการใช้กลูโคสสูงกว่า และ pH ลดลงมากกว่า ในขณะที่อัตราการใช้กลูโคสก็สูงกว่าที่ทุกช่วงของการเจริญ เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการผลิตกัมจะให้ค่าความหนืดสูงสุด (ชั่วโมงที่ 72) สูงกว่าเซลล์ซึ่งเพาะเลี้ยงในสูตรดั้งเดิมประมาณ 30% เมื่อพิจารณาค่าน้ำหนักกัมที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีค่าสูงกว่าที่ทุกช่วงของการเพาะเลี้ยงเท่ากันโดยเฉพาะที่ชั่วโมงที่ 120 จะมีค่าสูง กว่าเกือบเท่าตัว โดยที่ค่าเปอร์เซนต์ไพรูวิกจะไม่แตกต่างกันมากนัก

ในการศึกษา วิธีการตกตะกอนแซนแทนกัมที่เหมาะสม เริ่มต้นด้วย การศึกษาชนิดของเกลือที่เหมาะสมในการตกตะกอนกัมโดยเปรียบเทียบชนิดของเกลือคือ NaCl และ KCl ที่ใช้เมื่อความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-2.5% แล้วตกตะกอนกัมด้วยเอทานอล(2:1) จะเห็นได้ว่า KCl ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 1.5% จะมีข้อได้เปรียบ NaCl ที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ ทำให้การตกตะกอนกัมได้ผลผลิตสูงกว่าเมื่อไม่ใส่เกลือ หรือใช้ NaCl ที่ความเข้มข้นเดียวกันเกือบ 25% ที่ความเข้มข้น 2.5% KCl อย่างไรก็ตามการแปรผันความเข้มข้น KClให้สูงขึ้น พบว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้นก็จะทำให้ผลผลิตของตะกอนกัมที่ถูกตกลงมาได้มากขึ้น (รูปที่ 21) โดยที่ KCl ที่ความเข้มข้นสูงถึง 6% นี้ จะไม่มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงความหนืดของสารละลายกัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* เลย. มีรายงานว่าที่ความเข้มข้นของกัมต่ำๆ(น้อยกว่า 0.15%) NaCl จะมีอิทธิพลในการเพิ่มความหนืดให้สูงขึ้น (Kovacs, 1973) ในขณะที่ Rocks และคณะ(1971) พบว่า สารละลายแซนแทนกัมที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5% จะมีความหนืดมากขึ้น เมื่อเติมเกลือ NaCl หรือ KCl ลงไปเล็กน้อย

Sandford และคณะ (1977) รายงานว่า สารละลายแซนแทนกัม(2.5 ถึง 4%) ที่มี 1% KCl สามารถตกตะกอนได้ด้วยเอทานอลต่อสารละลาย 2:1 โดยปริมาตร ซึ่งผลการวิจัยนี้ได้ยืนยันว่า ความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้ตกตะกอนกัมจะให้ผลผลิตของตะกอนกัมสูงสุด ที่อัตราส่วนเอทานอลต่อสารละลายกัม 2:1 เช่นกัน และเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้น ผลผลิตของกัมที่ได้จะลดต่ำลง คาดว่า เอทานอลอาจมีผลต่อโครงสร้างของการม้วนตัว (tertiary structure) ของโพลิเมอร์ของกัมชนิดนี้ก็เป็นได้

4.3 <u>การขยายขนาดการผลิตสู่ถังชีวปฏิกรณ์ขนาด 2.5 ลิตร</u>

การผลิตแซนแทนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟองอากาศ (air bubble) ขนาดปริมาตรใช้งาน 2.5 ลิตร มีการให้อากาศ 1.6 v.v.m. ตลอดการทดลอง ในการทดลองเซลล์มีการเจริญได้ดีกว่าเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงในขวดเขย่า (รูปที่ 25) และเมื่อติดตามวัดค่า pH ของอาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว หลังจาก 12 ชม. ถ้าไม่ทำการปรับ pHเลย ค่า pH จะลดลงเหลือประมาณ 5.2 ถึง 5.5 และเมื่อพิจารณาปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อก็พบว่า มีการใช้กลูโคสไปอย่างรวดเร็วมากจนเกือบหมดภายในเวลา 96 ชม. ในขณะที่ขวดเขย่าจะยังเหลือกลูโคสประมาณ 10%

ค่าความหนืดของการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์จะเพิ่มขึ้นช้ากว่าเมื่อเลี้ยงแบบขวดเขย่า แต่ที่ชม.ที่ 96 จะให้ค่าความหนืดสูงประมาณ 300 เซนติพอยซ์ซึ่งสูงกว่าค่าที่วัดได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบขวดเขย่า ซึ่งถือเป็นสภาวะควบคุมเกือบ 3 เท่า ค่าความหนืดที่วัดได้จะสอดคล้องกับน้ำหนักกัมที่ตกตะกอนลงมา ซึ่งในช่วงแรกจะมีค่าต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่า แต่ที่ชม.ที่ 96 ซึ่งมีความหนืดสูงสุดนั้นจะให้ค่าตะกอนกัมสูงประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมประมาณ 40% อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า ค่าไพรูวิกต่อลิตรของอาหารเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์มีค่าต่ำกว่าในการเพาะเลี้ยงแบบขวดเขย่าประมาณ 6-7 เท่า ซึ่งหากค่าเหล่านี้เป็นจริงแล้วก็แสดงว่า น้ำหนักแห้ง ความหนืด ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้นั้น อาจมีกัมที่มีเปอร์เซนต์ไพรูเวตที่เข้าแทนที่ในโมเลกุลของ ดี-แมนโนส เป็นปริมาณที่ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น หากเป็นเช่นนี้จริงแล้วก็แสดงให้เห็นว่า แซนแทนกัมที่ผลิตได้โดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้นจะมีคุณภาพกัมแตกต่างไปจากกัมที่ผลิตได้ในระดับขวดเขย่า Sandford และคณะ (1977) ได้พบว่า การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของกัมจะเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่มีการเพาะเลี้ยงต่างกัน ทั้งนี้วิธีการหนึ่งซึ่งอาจใช้ติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของกัมอาจทำได้โดยติดตามวัดองค์ประกอบของไพรูเวตในกัมที่ผลิตได้

การทดลองชุดต่อมาได้พยายามกำจัดการปนเปื้อน โดยนำถังหมักไปผ่านการฆ่าราก่อนทำการทดลอง และปรับ pH ด้วย 2 M KOH ควบคุม pH ไม่ให้ต่ำกว่า 6 ตลอดการทดลอง เป็นไปตามรูปที่ 28 และในการทดลองนี้ อาหารจะเพิ่มปริมาณ (%) ฟอสเฟต (K_2HPO_4) เป็น 0.8% (ปกติใช้เป็น 0.4%) เพื่อเพิ่มความสามารถของการเป็นบัฟเฟอร์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป12ชม. pH ลดลงมาเหลือ 7 (จากเริ่มต้น 7.4) จึงเริ่มเติม 2 M KOH ในอัตรา 2.6 มล./ชม. ซึ่งเป็นอัตราต่ำสุด และวัด pH ทุก 12 ชม. เทียบกับชุดควบคุม พบว่าใน 2 วันแรก เซลล์มีการเจริญปกติ วันที่ 3 ของการหมัก อาหารเริ่มมีกลิ่นแอลกอฮอล์ จึงคาดว่ามีการปนเปื้อนของยีสต์ สีของอาหารมีสีเหลืองปกติ แต่จากการสังเกตพบว่าเนื้อของอาหารมีลักษณะเป็นเนื้อทรายจึงคิดว่าเกิดจากการที่ให้อากาศผ่านเข้าไปและคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศคงจะไปทำปฏิกิริยากับเกลือโปแตสเซียมที่เหลือจากการปรับ pH กลายเป็นเกลือคาร์บอเนตทำให้อาหารมีลักษณะเป็นเนื้อทราย

ในวันที่ 4 ของการหมัก สังเกตได้ว่า pH จะเริ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงประมาณ 8 ขณะที่หยุดการเติม KOH ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 60 ได้กลิ่นแอลกอฮอล์แรงขึ้น สีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มต่างจากชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัด สังเกตภายในคอลัมน์หมัก น่าจะมีความหนืดเหนียว แต่เมื่อชักตัวอย่างออกมามีความเหนียวน้อยมาก รวมถึงปริมาณกัมและกรดไพรูวิกด้วย ในวันที่ 5 ของการหมัก pH สูงขึ้นอีกเกือบจะถึง 9 และพบว่ามีการปนเปื้อนของราเป็น pellet และไม่พบน้ำตาลเหลืออยู่เลย เมื่อวัดปริมาณกัม ความหนืด และ กรดไพรูวิก จะมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองที่แล้ว แต่ได้กรดไพรูวิกสูงกว่า ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลง pH ตลอดการทดลองนี้ แตกต่างออกไป สรุปได้ว่า การทดลองครั้งนี้ยังพบกับปัญหาการปนเปื้อนอยู่ แม้จะมีการควบคุม pH ตลอดการทดลองแล้วก็ตาม มีรายงานของ Maraine และ Regovin (1971) เกี่ยวกับการควบคุม pH ให้อยู่ประมาณ 7 ตลอดการทดลองด้วย 0.4 N NaOH โดยมีกลูโคส 5% เป็นแหล่งต้นคาร์บอนเทียบกับการที่ไม่ได้ปรับ pH เลย พบว่าในชั่วโมงที่ 48 pH ลดลงจาก 7 เหลือประมาณ 5 ให้ความหนืด 5800 เซนติพอยซ์ มีกลูโคสเหลือ 3% เมื่อทำการเปรียบเทียบด้วย KOH และควบคุมให้คงที่อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 วัน จนเซลล์มีการใช้กลูโคสหมด พบว่ามีความหนืดมากกว่า 15000 เซนติพอยซ์ และ ให้ผลผลิตกัมถึง 3% และใช้ 0.8 N NH_4OH ปรับ pH แทน KOH ในสภาวะการเลี้ยงเดียวกัน พบว่า เซลล์มีการใช้กลูโคสหมดภายใน 46 ชม. มีความหนืดเพียง 9000 เซนติพอยซ์ และได้ผลผลิตกัม 2.6% สำหรับ Cadmus และคณะ (1978) ได้มีการทดลองแสดงถึงผลของการควบคุม pH ด้วย 1M NaOH ในถังหมักขนาด 20 ลิตร หมักจน pH ต่ำประมาณ 6 จึงเริ่มควบคุมจนกระทั่งกลูโคสหมด ซึ่ง Cadmus เสนอว่าผลผลิตกัมจะสูงต้องควบคุม pH ไม่ให้ต่ำกว่า 6.8 และควรใช้ K_2HPO_4

เป็นแหล่งบัฟเฟอร์ดีกว่าการใช้ ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต ซึ่งจะทำให้ความหนืด และปริมาณกรดไพรูวิกดีกว่าด้วย แต่ถ้าจะให้ดีควรใช้คู่กัน

มีรายงานของ Cadmus (1978) ยืนยันว่า การให้อากาศที่สูง สามารถเพิ่มผลผลิตแซนแทนได้โดยเลี้ยง *X. campestris* ในถังหมัก 10 ลิตร และแปรผันการให้อากาศ จาก 0.25, 0.75, 1.5 พบว่าในวันที่ 3 ของการเลี้ยงได้ความหนืด 5060, 5540, 6040 เซนติพอยซ์ ตามลำดับ มีปริมาณกรดไพรูวิก 3.2, 3.6, 3.6 กรัม/100 กรัม ตามลำดับ Pons และคณะ (1988) สรุปว่า การผลิตแซนแทนโดยการหมักแบบฟองอากาศ สามารถทำให้อาหารที่หมักมีความเป็นเนื้อเดียวกันได้ดีและมีการกระจายอากาศอย่างทั่วถึง ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบกว่าการหมักโดยใช้ใบพัดกวน (stirer tank) เพราะไม่มีจุดอับของการให้อากาศ (dead zone) เมื่อความหนืดของแซนแทนสูงขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อสังเกตและข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ จะเห็นได้ว่า ปัญหาใหญ่ที่ต้องประสบและแก้ไขได้ยากยิ่งมีหลายประการ เริ่มตั้งแต่ ความไม่เสถียรของสายพันธุ์ *Xanthomonas campestris* ที่ได้รับจาก NRRL ในการผลิตแซนแทน กัม ถึงแม้ว่า จะได้พยายามเริ่มต้นด้วยการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกัมได้สูง โดยใช้สายพันธุ์ที่ให้โคโลนีขนาดใหญ่และพยายามแก้ปัญหาการลดประสิทธิภาพของการผลิตกัม โดยใช้เชื้อที่แยกได้และถ่ายเชื้อครั้งแรกเป็น stock culture หลายๆหลอดแล้วเก็บโดยวิธีการหยุดเมตาบอลิซึมในอาหารแข็งที่คลุมด้วยพาราฟิน หรือใช้เชื้อ stock ที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธี ltophilizer ก็ยังไม่สามารถหยุดยั้งการสูญเสียประสิทธิภาพในการผลิตกัมของเชื้อ *Xantho monas campestris* ที่คัดเลือกได้อย่างแท้จริง ดังนั้นในการศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเพิ่มผลผลิตของแซนแทน ไม่ว่าจะวัดออกมาด้วยค่าความหนืดหรือค่าน้ำหนักแห้งของกัมที่แต่ละการทดลอง จะเห็นว่า เซลล์ที่ใช้จะมีประสิทธิภาพของการผลิตกัมแตกต่างกันออกไปในแต่ละการทดลอง ในการวิจัย จึงได้พยายามศึกษาปัจจัยที่แปรเปลี่ยนไปโ ดยเทียบจากการเจริญและการผลิตแซนแทน กัม กับสูตรอาหารที่ใช้ แล้ววิเคราะห์ผลกระทบของปัจจัยดังกล่าว โดยเทียบกับค่าที่เพาะเลี้ยงในสูตรมาตรฐานที่ควบคุมไว้ในสภาวะเดิม หาไม่แล้วงานวิจัยนี้จะไม่สามารถดำเนินไปได้เลย ดังนั้น เมื่อได้อาหารสูตรปรับปรุงใหม่แล้วจึงนำมาเปรียบเทียบการเจริญและผลิตแซนแทน กัม กับสูตรดั้งเดิม ซึ่งก็ได้ผลว่าสูตรปรับปรุงใหม่เพื่อใช้เพาะเลี้ยง *Xanthomonas campestris* ที่คัดเลือกไว้ จะให้ค่าการเจริญและผลผลิตแซนแทนกัมสูงกว่าสูตรดั้งเดิมที่ตลอดทุกช่วงการเจริญ อย่างไรก็ตามการแก้ปัญหานี้ได้ จำเป็นต้องมีการศึกษาแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพ การผลิตแซนแทนเสถียรพอหรือไม่ ก็ต้องมีวิธีเก็บรักษาเชื้อที่มีคุณภาพสูง ซึ่งปัญหานี้เป็นปัญหาใหญ่ของงานวิจัยและพัฒนาในการผลิตแซนแทนในระดับอุตสาหกรรมปัจจุบัน

ปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการเลี้ยง *X. campestris* เพื่อผลิต แซนแทน กัม ในถังชีวปฏิกรณ์คือการปนเปื้อน (contaminate) ของเชื้อแปลกปลอมเมื่อใช้เครื่องที่ประกอบขึ้นด้วยพลาสติก PVC ทำให้การนึ่งฆ่าเชื้อทำไม่ได้ การพยายามฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ ไม่ว่าจะใช้แสงอุลตราไวโอเลต ล้างด้วยเอทานอล หรือแช่ยาฆ่ารา ล้วนแล้วทำได้ยากเพราะจะไปทำลายเนื้อพลาสติก PVC ซึ่งทำให้เตรียมสภาวะปลอดเชื้อได้ยากยิ่ง โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงนาน 96 ชั่วโมง (4 วัน) โอกาสปนเปื้อนจะยิ่งสูงขึ้นอีก จากผลการทดลองที่รายงานนี้เป็นผลที่ได้จากการพยายามทำการทดลองซ้ำแล้วซ้ำอีกโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อมากมายหลายวิธีเกือบสิบครั้ง ได้

ผลออกมาตามที่รายงาน ดังนั้นหากจะทำการวิจัยให้ได้ผลแล้วจำเป็นต้องมีถังชีวปฏิกรณ์ที่เป็นแก้ว หรือ stainless steel ที่สามารถนึ่งฆ่าเชื้อและมีระบบนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำเพื่อความเหมาะสมในการดำเนินงานต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลงานวิจัย

1. เชื้อ *X. campestris* ที่ได้รับจาก NRRL มีการแปรเปลี่ยนประสิทธิภาพของการผลิตแซนแทนและการเจริญโดยสามารถแบ่งเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไปเป็นเวลานาน 3-4 เดือนได้ 3 กลุ่ม มีขนาดของโคโลนี 3 ขนาดคือ ขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็ก ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.65, 0.56, 0.48 มม. ตามลำดับ เมื่อนำมาเลี้ยงเปรียบเทียบกัน โคโลนีขนาดใหญ่ให้ความหนืด ปริมาณกัม และกรดไพรูวิกสูงที่สุด จึงเลือกโคโลนีขนาดใหญ่มาศึกษาทุกการทดลอง

2. การถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่อง 20 ครั้ง (ทุก 14 วัน) จะทำให้ได้ *X. campestris* ที่มีคุณสมบัติของการเจริญและประสิทธิภาพของการผลิตแซนแทนลดลงอย่างชัดเจน

3. ที่อุณหภูมิ 28 °ซ ถึง 30 °ซ *X. campestris* สามารถเจริญและผลิตแซนแทนกัมได้ดีแต่ที่อุณหภูมิ 30 °ซ พบว่ามีการเจริญและผลิตกัมสูงสุดที่ชั่วโมง 144 คือ 40 กรัมต่อลิตร มีความหนืด 200 เซนติพอยซ์

4. ความเร็วรอบของการเขย่าขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ในเครื่องเขย่า Phychrotherm ที่มีอาหารสร้างแซนแทนบรรจุอยู่ 50 มล. ต่างๆกัน ไม่มีผลทำให้การเจริญของเซลล์แตกต่างกัน แต่ที่ความเร็วรอบของการเขย่า 250 รอบต่อนาที จะให้ความหนืดสูงสุด 900 เซนติพอยซ์ ปริมาณกัม 25 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกรดไพรูวิก 130 มิลลิกรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96

5. สูตรอาหารสร้างแซนแทน กัม ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนให้การเจริญสูงกว่าอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเมื่อใช้ความเข้มข้นเท่ากัน (2.25 เปอร์เซนต์) มีค่าความหนืดและปริมาณกัมสูงถึง 550 เซนติพอยซ์และ 14 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

6. ความเข้มข้นกลูโคสที่ 3 เปอร์เซนต์ สามารถให้การเจริญและผลผลิตแซนแทน กัมสูงสุดโดยในชั่วโมงที่ 96 ให้ความหนืด 220 เซนติพอยซ์ ให้ปริมาณกัม 18 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกรดไพรูวิก 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

7. ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตที่ 0.08 เปอร์เซนต์ สามารถให้การเจริญและการผลิตแซนแทน กัมสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 72 มีความหนืดสูงสุด 130 เซนติพอยซ์ ให้ปริมาณกัมสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 14 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดไพรูวิก 120 มิลลิกรัมต่อลิตร

8. ความเข้มข้นของไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ 0.4 เปอร์เซนต์ สามารถให้การเจริญและการผลิตแซนแทน กัมสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ให้ความหนืด 50 เซนติพอยซ์ ปริมาณกัมสูงสุด และไพรูวิกสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 6.7 กรัมต่อลิตร และ 240 มิลลิกรัมต่อลิตร

9. ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ 0.01 เปอร์เซนต์ สามารถให้การเจริญและการผลิตแซนแทนกัมสูงสุดชั่วโมงที่ 96 มีความหนืด 250 เซนติพอยซ์ ให้ปริมาณกัม 13 กรัมต่อลิตร มีปริมาณไพรูวิก 350 มิลลิกรัมต่อลิตร

10. เกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่สามารถช่วยเพิ่มปริมาณกัมในระหว่างการตกตะกอนกัมด้วยเอทธานอล ขณะที่เกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ช่วยเพิ่มปริมาณกัมได้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นจนถึง 5 เปอร์เซนต์ แต่ไม่มีผลในการเพิ่มความหนืดของสารละลายแซนแทน กัมเลย

11. อัตราส่วนที่เหมาะสมของปริมาณเอทธานอลที่ใช้ในการตกตะกอนกัม เมื่อมี 1 เปอร์เซนต์ โปตัสเซียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2 ต่อ 1

12. *X. campestris* ที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุงใหม่ที่มี 3 เปอร์เซนต์กลูโคส 0.4 เปอร์เซนต์ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.08 เปอร์เซนต์ แอมโมเนียมไนเตรต 0.01 เปอร์เซนต์แมกนีเซียม จะให้ค่าการเจริญ(A_{650} และน้ำหนักแห้ง) ผลผลิตของแซนแทน (ความหนืดและน้ำหนักกัมแห้ง และไพรูเวท) สูงกว่าเชื้อชนิดเดียวกันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดังเดิม

13. การเพาะเลี้ยง *X. campestris* ที่คัดเลือกได้ในถังหมักปฏิกรณ์แบบฟองอากาศขนาดปริมาตรทำงาน 2.5 ลิตร โดยใช้องค์ประกอบและสภาวะที่ศึกษาได้จากการเพาะเลี้ยงแบบขวดเขย่า(เมื่อไม่มีการควบคุม pH) สามารถเจริญ (A_{650} nm และน้ำหนักแห้ง) ได้ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะขวดเขย่าที่ทุกช่วงของระยะการเจริญ การผลิตแซนแทน กัม (ความหนืดและน้ำหนักแห้ง) ในช่วงแรกของการเจริญมีค่าต่ำกว่า แต่ที่ชั่วโมงที่ 96 จะให้ความหนืดและน้ำหนักกัมสูงกว่าอย่างชัดเจน แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันโดยควบคุม pH ให้อยู่ระหว่าง 6.5-7.0 โดยใช้ 2 M KOH ปรากฏว่าไม่ได้ผลการทดลองที่สม่ำเสมอและรายงานผลได้ยาก เพราะมีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายนอกตลอดเวลา ถึงแม้จะพยายามทำการทดลองซ้ำถึง 5 ครั้ง ก็ไม่สามารถเอาชนะอุปสรรคเนื่องจากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายนอกได้เลย