บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสที่เวลาต่างกัน

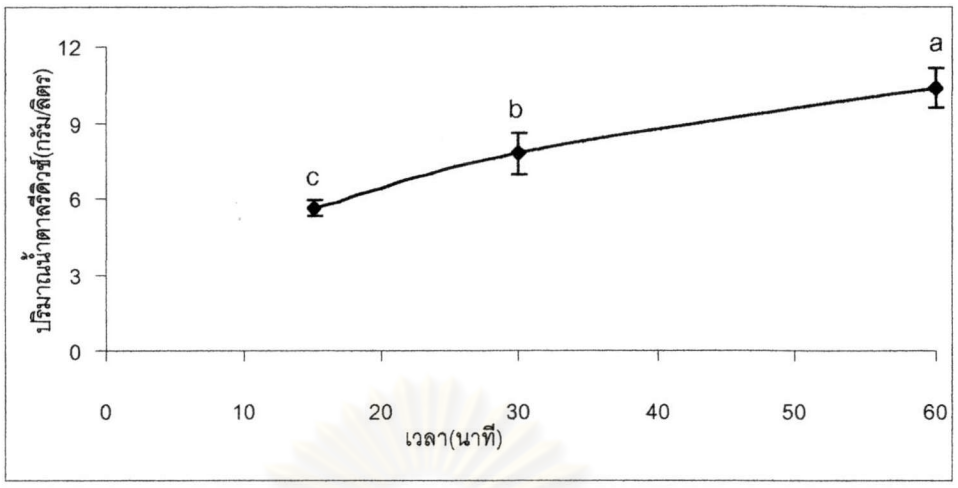
องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังซึ่งวิเคราะห์โดย สุนีย์ โชตินีรนาท (2539) ได้ผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง (สุนีย์ โชตินีรนาท, 2539)

องค์ประกอบทางเคมี	เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก)
ความชื้น	12.24 ± 0.27
โปรตีน	3.39 ± 0.04
ไขมัน	0.24 ± 0.15
ไฟเบอร์	15.26 ± 0.08
เถ้า	2.65 ± 0.02
คาร์โบไฮเดรต	66.22

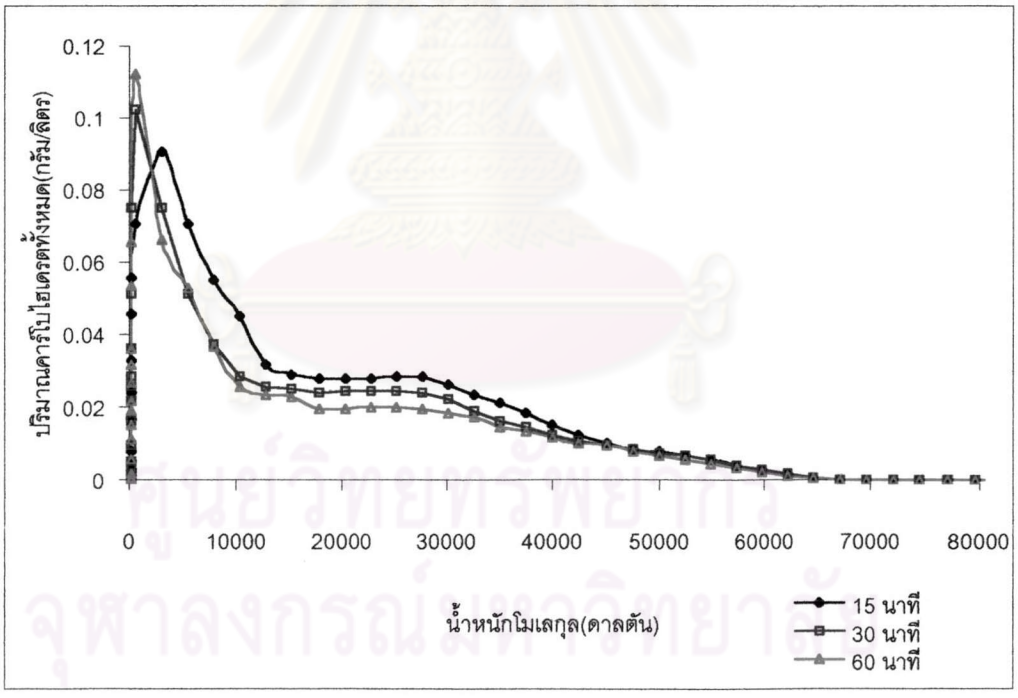
เมื่อย่อยกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.8 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 15, 30 และ 60 นาที พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยที่เวลา 15, 30 และ 60 นาที มีค่าเป็น 5.58, 7.77 และ 10.38 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.1

ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นตามเวลาในการย่อย เนื่องจากโอกาสที่เอนไซม์เข้าไปตัดสายโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตมีมากขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการย่อย ทำให้สายคาร์โบไฮเดรตมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย และมีจำนวนสายมากขึ้น เป็นผลทำให้ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ย่อย ซึ่งสามารถยืนยันได้อย่างชัดเจนจากผลวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography ดังแสดงในรูปที่ 4.2 (ภาคผนวก ข 7)



รูปที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยแอลฟา-อะไมเลส ที่เวลาต่างกัน

a, b, c ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)



รูปที่ 4.2 น้ำหนักโมเลกุลและปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลส ที่เวลาต่างกัน

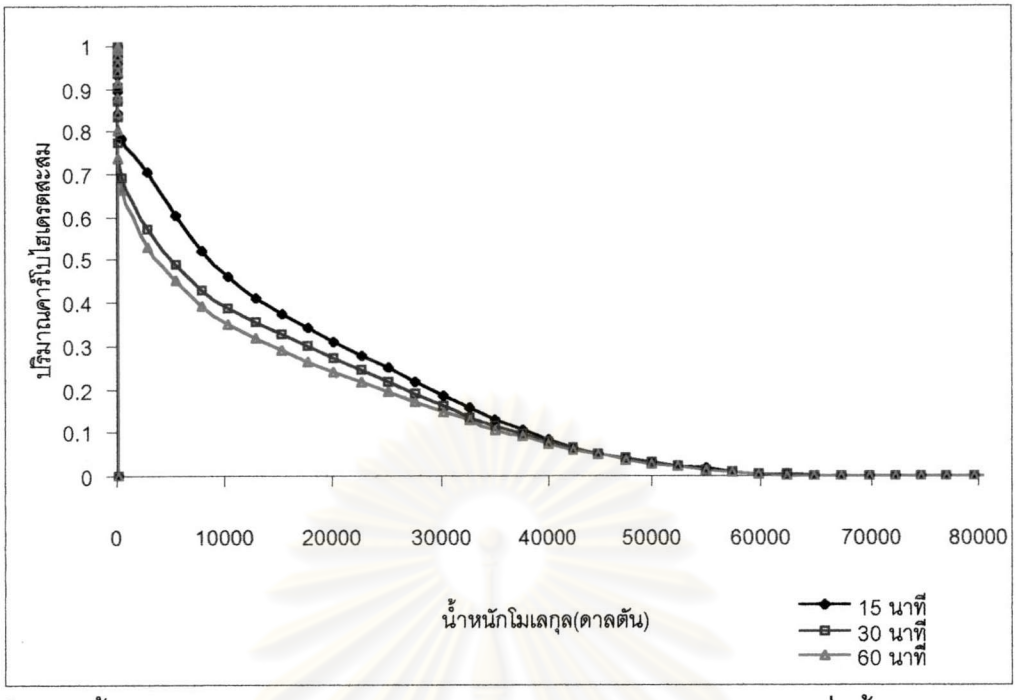
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แสดงให้เห็นว่า น้ำหนักโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดซึ่งดูได้จากกราฟในตำแหน่งที่มีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดมีค่ามากสุดที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเปลี่ยนแปลงไปโดยจะลดลงเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น นอกจากนี้ร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดต่อคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ซึ่งคำนวณได้จากพื้นที่ใต้รูปจะเพิ่มขึ้น และมีค่าสมมูลเดกซโตรสสูงขึ้นตามระยะเวลาการย่อย ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และพบว่าร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลใหญ่กว่า 17,843 ดาลตันต่อคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เริ่มเข้าสู่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุด มีค่าลดลงเรียงลำดับเวลาจาก 15, 30 และ 60 นาที จะได้ร้อยละของคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 34.13, 29.82 และ 26.48 ตามลำดับ แสดงว่าปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะลดลงตามระยะเวลาในการย่อย เมื่อนำข้อมูลการวิเคราะห์มาคำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตสะสมของไฮโดรไลเซทที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ จะได้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 8856, 5147 และ 4009 ดาลตัน ที่ระยะเวลาการย่อย 15, 30 และ 60 นาที ตามลำดับ ดังในรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและค่าสมมูลเดกซโตรสของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสที่เวลาต่างๆ

	เวลาย่อย 15 นาที	เวลาย่อย 30 นาที	เวลาย่อย 60 นาที
น้ำหนักโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุด (ดาลตัน)	3024	554	554
ร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดต่อคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	65.87	70.18	73.52
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(กรัมต่อลิตร)	$5.58^{c} \pm 0.31$	$7.77^{b} \pm 0.80$	$10.38^{a} \pm 0.76$
ค่าสมมูลเดกซโตรส	12.62	17.08	22.22

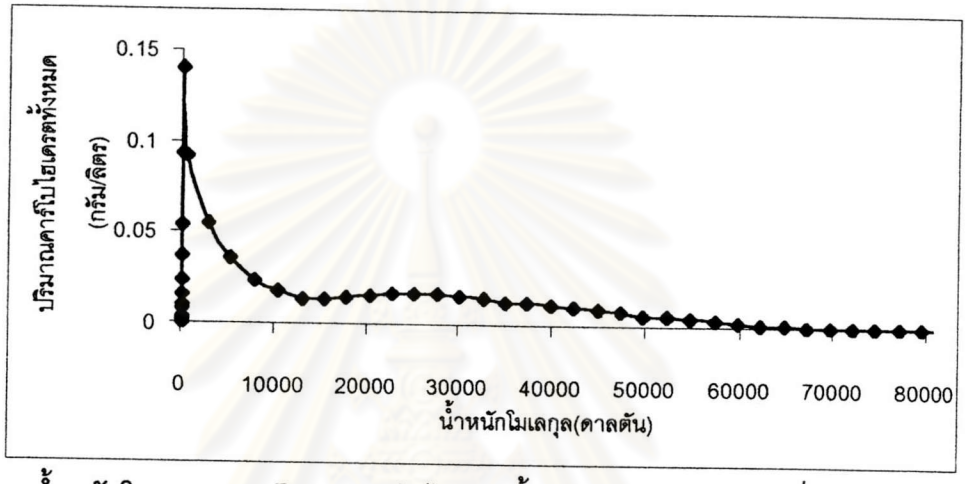
a, b, c ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($P \leq 0.05$)



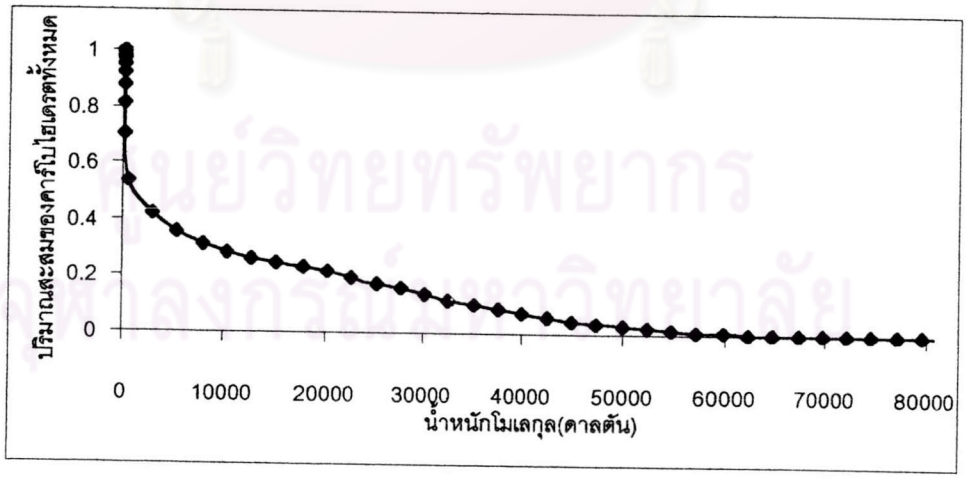
รูปที่ 4.3 น้ำหนักโมเลกุลและปริมาณคาร์โบไฮเดรตสะสมของไฮโดรไลเซทที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสที่เวลาต่างกัน

นอกจากนี้เพื่อเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกลูโคสให้มากที่สุดเท่าที่เป็นไปได้เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้กากมันสำปะหลังผลิตแซนแทนกัม จึงเลือกไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง มาย่อยต่อด้วยกลูโคอะไมเลส เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากเหลืออยู่น้อยกว่าไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 30 นาที จะทำให้ใช้เวลาในการย่อยต่อให้ได้กลูโคสปริมาณมากด้วยกลูโคอะไมเลสน้อยลง และจะทำให้การย่อยต่อให้เป็นกลูโคสมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการย่อยต่อโดยเติมกลูโคอะไมเลส 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และย่อยต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 38.84 กรัมต่อลิตร และผลการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography เป็นดังรูปที่ 4.4 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดเท่ากับ 180 ดาลตัน และ ร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดดังกล่าวต่อคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเท่ากับ 76.84 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ใหญ่กว่า 17843 ดาลตันต่อคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเท่ากับ 23.16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำข้อมูลการวิเคราะห์มาคำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตสะสมของไฮโดรไลเซท ได้ดังรูปที่ 4.5 จะได้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 1282 ดาลตัน และมีค่าสมมูลเดกซโตรสเท่ากับ 82.62

การนำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมาช่วยย่อยพร้อมกับแอลฟาอะไมเลส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะทำให้น้ำหนักโมเลกุลน้อยลง คาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะเพิ่มขึ้น และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้แอลฟาอะไมเลสเพียงอย่างเดียวถึง 3.7 เท่า สรุปได้ว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะทำให้การย่อยสมบูรณ์ขึ้นคือได้น้ำตาลกลูโคสมากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีหน้าที่ย่อยสายคาร์โบไฮเดรตจากปลายสายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าไปทีละ 1 หน่วยของกลูโคส ซึ่งผลผลิตที่ได้จะเป็นกลูโคส(ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)



รูปที่ 4.4 น้ำหนักโมเลกุลและปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อด้วย กลูโคอะไมเลสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง



รูปที่ 4.5 น้ำหนักโมเลกุลและปริมาณคาร์โบไฮเดรตสะสมของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อด้วย กลูโคอะไมเลสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

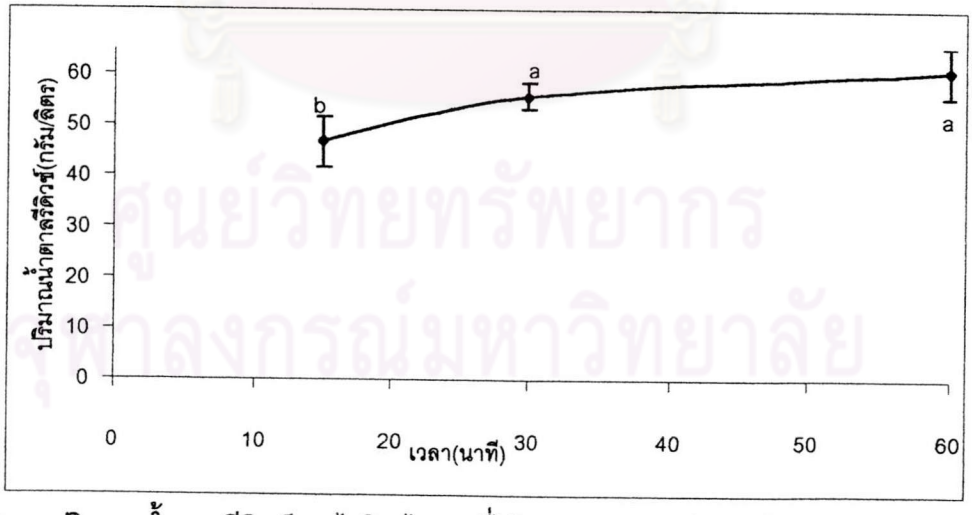
4.2 ผลการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสที่เวลาต่างกัน

องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังโดยทั่วไปแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังโดยทั่วไป (Swinkels, 1983)

องค์ประกอบทางเคมี	เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก)
ความชื้น	13.0
แป้ง	87.0
ไขมัน	0.1
โปรตีน	0.1
เถ้า	0.2
ฟอสฟอรัส	0.01
สารที่ให้กลิ่นรส	(ต่ำมาก)

เมื่อย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยสภาวะเดียวกับที่ย่อยกากมันสำปะหลัง พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยที่เวลา 15, 30 และ 60 นาที มีค่าเป็น 46.79, 55.95 และ 60.91 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลส ที่เวลาต่างกัน

a, b ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

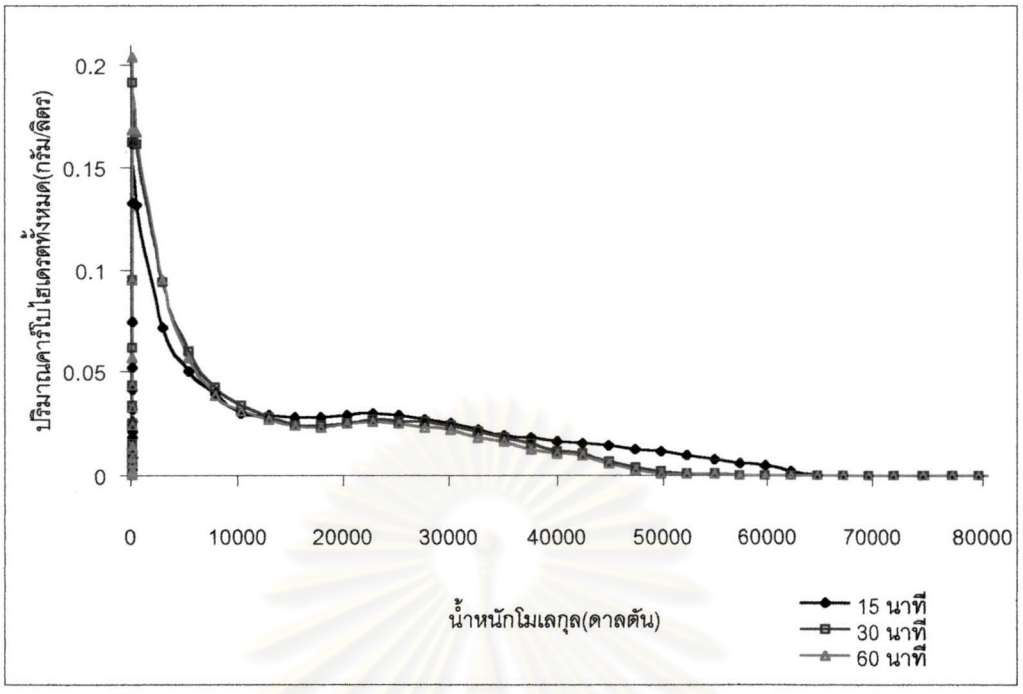
ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังจะสูงขึ้นตามเวลาในการย่อย เช่นเดียวกับการย่อยกากมันสำปะหลัง เมื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่าได้น้ำหนักโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดเป็น 180 ดาลตัน ตั้งแต่ระยะเวลาการย่อย 15 นาที ซึ่งได้น้ำตาลกลูโคสเร็วกว่าที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง ทั้งนี้เนื่องจากแป้งมันไม่มีองค์ประกอบที่เป็นไฟเบอร์ซึ่งเป็นสารประกอบเพกตินและเซลลูโลสที่มีอยู่ในผนังเซลล์พืช ที่จะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์จึงทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งของเอนไซม์ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สุภาวดี ดิสโร (2543) พบว่า เมื่อไม่มีไฟเบอร์ในกากมันสำปะหลังจะทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปย่อยโมเลกุลแป้งได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มจาก 27.23 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 32.63 กรัมต่อลิตร

การเพิ่มเวลาในการย่อยให้นานขึ้นจะทำให้ร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุด(น้ำหนักโมเลกุล 180 ดาลตัน) ต่อคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด และค่าสมมูลเดกซโตรสสูงขึ้น ดังแสดงใน ตารางที่ 4.4 และร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่า 17843 ดาลตันต่อคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดจะลดลง ถ้าเรียงลำดับเวลาจาก 15, 30 และ 60 นาที จะได้ร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มากกว่า 17843 ดาลตันต่อคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเท่ากับ 25.13, 18.12 และ 16.94 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกันกับการย่อยกากมันสำปะหลัง ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสะสมของน้ำหนักโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 4.8 ได้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 1819, 751 และ 559 ดาลตัน ตามระยะเวลาในการย่อยที่ 15, 30 และ 60 นาทีตามลำดับ

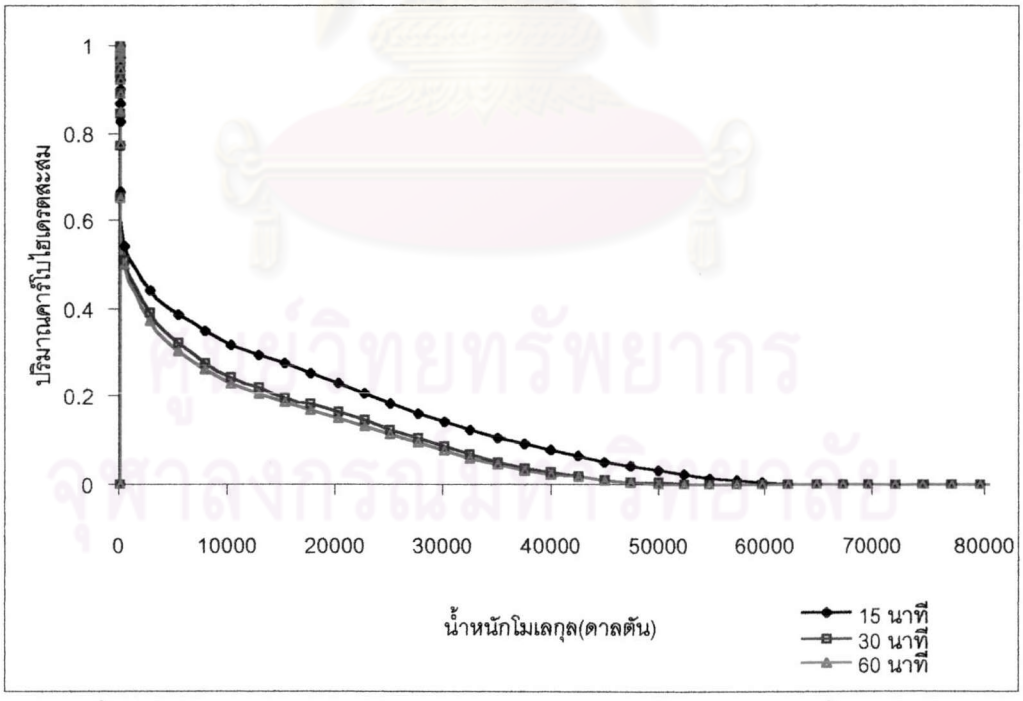
ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและค่าสมมูลเดกซโตรสของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสที่เวลาต่างๆ

	เวลาย่อย 15 นาที	เวลาย่อย 30 นาที	เวลาย่อย 60 นาที
น้ำหนักโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุด (ดาลตัน)	180	180	180
ร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดต่อคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	74.87	81.88	83.06
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(กรัมต่อลิตร)	$46.79^{b} \pm 4.88$	$55.95^{a} \pm 2.74$	$60.91^{a} \pm 5.01$
ค่าสมมูลเดกซโตรส	71.02	83.34	84.75

a, b ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)



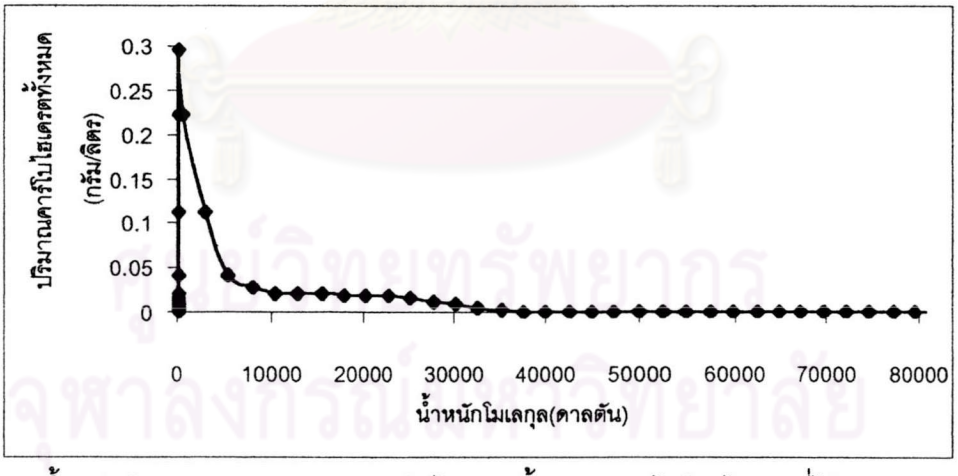
รูปที่ 4.7 น้ำหนักโมเลกุลและปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลส



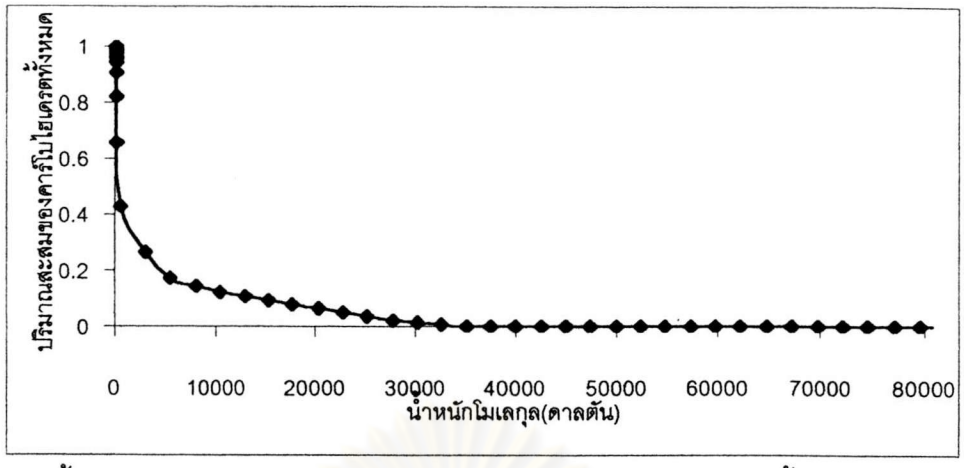
รูปที่ 4.8 น้ำหนักโมเลกุลและปริมาณคาร์โบไฮเดรตสะสมของไฮโดรไลเซทน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลส

นอกจากนี้เพื่อเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกลูโคสให้มากที่สุดเท่าที่เป็นไปได้เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้แป้งมันสำปะหลังผลิตแซนแทนกัม จึงเลือกไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง มาย่อยต่อด้วยกลูโคอะไมเลส เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากเหลืออยู่น้อยกว่าไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 30 นาที จึงน่าจะทำให้การย่อยต่อให้เป็นกลูโคสมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยใช้ไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการย่อยต่อโดยเติมกลูโคอะไมเลส 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และย่อยต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 72.23 กรัมต่อลิตร และผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography เป็นดังรูปที่ 4.9 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดเท่ากับ 180 ดาลตัน และ ร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดดังกล่าว ต่อคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเท่ากับ 92.44 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่า 17,843 ดาลตันต่อคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเท่ากับ 7.55 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสะสมของน้ำหนักโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 4.10 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 436 และมีค่าสมมูลเดกซโตรสเท่ากับ 95.43

การใช้กลูโคอะไมเลสช่วยย่อยแป้งมันสำปะหลังพร้อมกับแอลฟาอะไมเลส ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้แอลฟาอะไมเลสอย่างเดียวถึง 1.2 เท่า และร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดต่อคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 83.06 เป็น 92.44 ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการย่อยกากมันสำปะหลัง



รูปที่ 4.9 น้ำหนักโมเลกุลและปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อด้วยกลูโคอะไมเลสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง



รูปที่ 4.10 น้ำหนักโมเลกุลกับปริมาณคาร์โบไฮเดรตสะสมของไฮโดรไลเซทน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อด้วย กลูโคอะไมเลสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 15, 30, 60 นาที และ แอลฟา-อะไมเลสกับกลูโคอะไมเลสเป็นเวลา 180 นาที จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 46.79, 55.95, 60.91 และ 72.22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยแอลฟา-อะไมเลสที่ภาวะเดียวกัน ที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.58, 7.77, 10.38 และ 38.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังไม่มีไฟเบอร์ไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์สามารถย่อยแป้งได้มีประสิทธิภาพดีกว่ากากมันสำปะหลัง ไฮโดรไลเซทของแป้งมันจึงมีน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า และมีน้ำหนักโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดเท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคส (180) ตั้งแต่ที่เวลาย่อย 15 นาที เมื่อเพิ่มเวลาในการย่อย พบว่าแป้งมันและกากมันสำปะหลังมีแนวโน้มเช่นเดียวกันคือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดเพิ่มขึ้น, น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยลดลง, น้ำหนักโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดน้อยลง และ ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 17,843 ดาลตันน้อยลง เพื่อศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกันของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณและความหนืดของแซนแทนกัมที่ผลิตได้โดยเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 จึงเลือกไฮโดรไลเซทจากแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 15, 30 นาที และ แอลฟา-อะไมเลสกับกลูโคอะไมเลสเป็นเวลา 180 นาที ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 1819, 751 และ 436 ดาลตัน ตามลำดับ ด้วยเหตุผลเช่นเดียวกันจึงเลือกกากมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 15, 30 นาที และ แอลฟา-อะไมเลสกับกลูโคอะไมเลสเป็นเวลา 180 นาที ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 8856, 5147, 4009 และ 1282 ดาลตัน ตามลำดับ

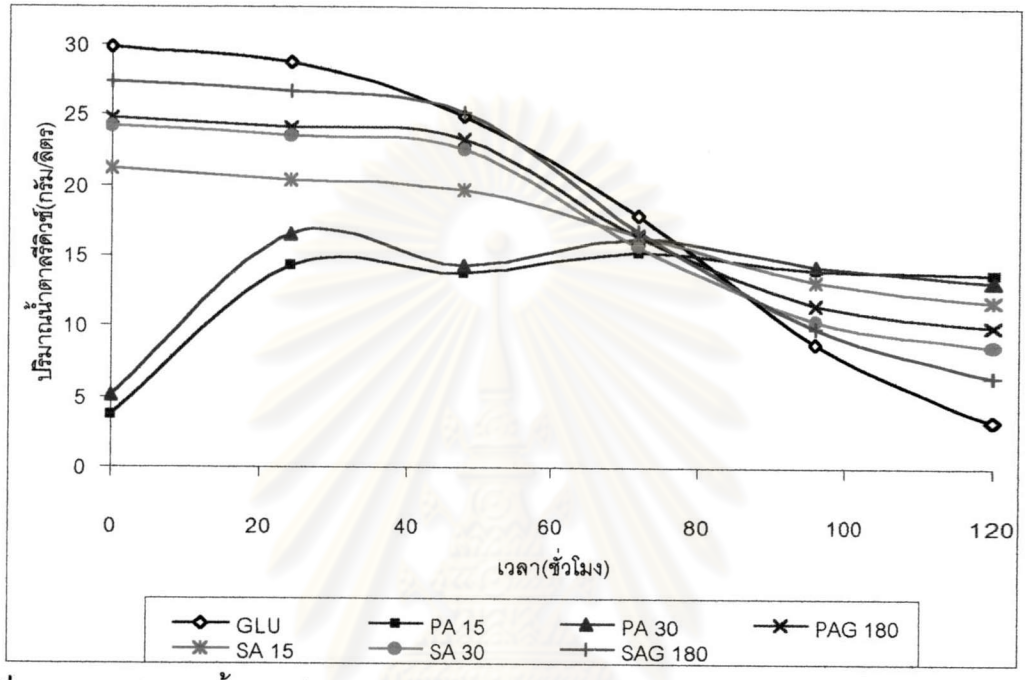
4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันต่อการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840

เพื่อศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกันของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณและความหนืดของแซนแทนกัมที่ผลิตได้โดยเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 จึงเลือกแหล่งคาร์บอนที่มีความหลากหลายของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกากมันมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 15(PA 15), 30(PA 30), 60 นาที และ แอลฟาอะไมเลส 1 ชั่วโมงต่อด้วยกลูโคอะไมเลส 2 ชั่วโมง(PAG 180) มีค่าเท่ากับ 8856, 5147, 4009 และ 1282 ดาลตันตามลำดับ จึงเลือกแหล่งคาร์บอนจากการย่อยกากมันมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 15, 30 นาที และ แอลฟาอะไมเลส 1 ชั่วโมงต่อด้วยกลูโคอะไมเลส 2 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 15(SA 15), 30(SA 30), 60 นาที และ แอลฟาอะไมเลส 1 ชั่วโมงต่อด้วยกลูโคอะไมเลส 2 ชั่วโมง(SAG 180) มีค่าเท่ากับ 1819, 751, 559 และ 436 ดาลตันตามลำดับ ด้วยเหตุผลเดียวกันจึงเลือกแหล่งคาร์บอนจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 15, 30 นาที และ แอลฟา-อะไมเลส 1 ชั่วโมงต่อด้วยกลูโคอะไมเลส 2 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส และได้แสดงค่าต่างๆ ดังตารางที่ 4.5

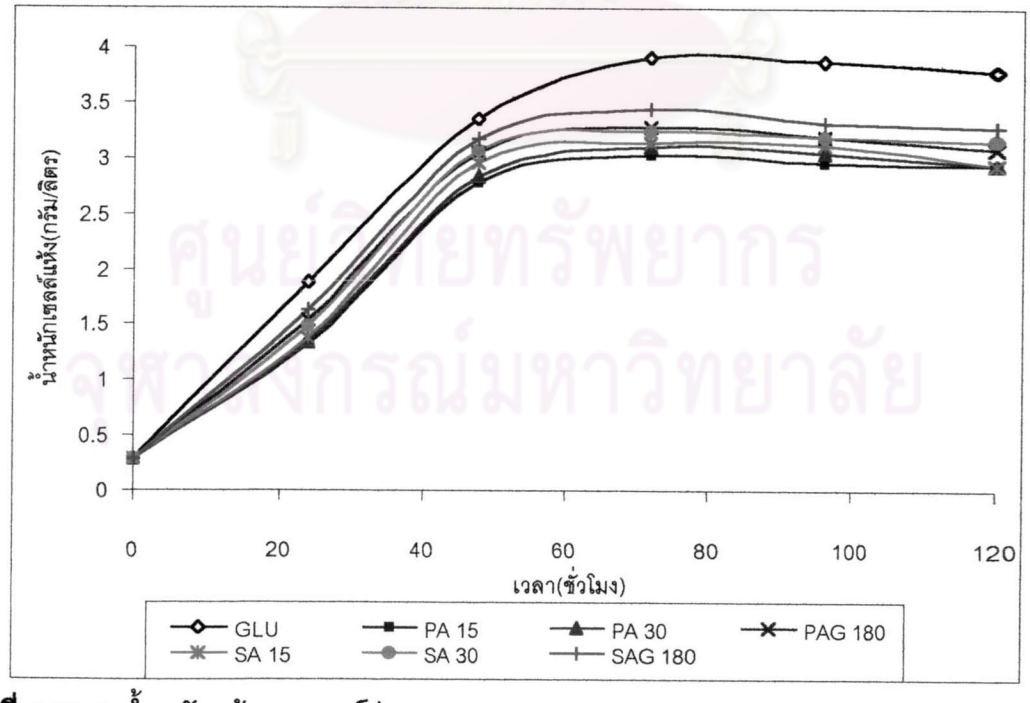
ตารางที่ 4.5 ผลวิเคราะห์ที่ได้จากกากมันหรือแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์

ไฮโดรไลเซท	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย	น้ำหนักโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุด (ดาลตัน)	ร้อยละของคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดต่อคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	ค่าสมมูลเดกซโตรส
กากมันสำปะหลังที่เวลาย่อย 15 นาที (PA 15)	8856	3024	65.87	5.58	12.62
กากมันสำปะหลังที่เวลาย่อย 30 นาที (PA 30)	5147	554	70.18	7.77	17.08
กากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลส 60 นาที ต่อด้วยกลูโค- อะไมเลส 120 นาที (PAG 180)	1282	180	73.52	38.83	82.62
แป้งมันสำปะหลังที่เวลาย่อย 15 นาที (SA 15)	1819	180	74.87	46.79	71.02
แป้งมันสำปะหลังที่เวลาย่อย 30 นาที (SA 30)	751	180	81.88	55.95	83.34
แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลส 60 นาที ต่อด้วยกลูโค- อะไมเลส 120 นาที (SAG 180)	436	180	83.06	72.22	95.43

โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของธันยาภรณ์ นาวินวรรณ(2542) ที่ได้ปรับปรุงจากสูตรของ Roseiro et al. (1992) โดยเปรียบเทียบกับการใช้กลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์, การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ และ ปริมาณแซนแทนกัมที่เกิดขึ้น ได้ผลดังรูปที่ 4.11

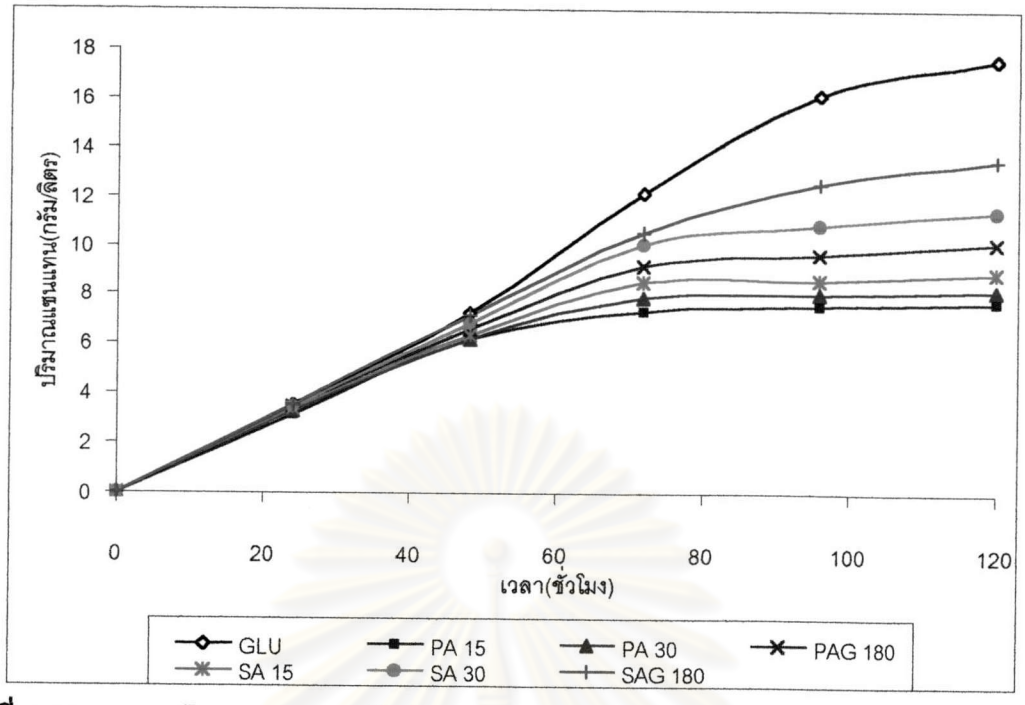


รูปที่ 4.11.ก. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อเวลา



รูปที่ 4.11.ข. น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อเวลา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.11.ค. ปริมาณแซนแทนกัมต่อเวลา

รูปที่ 4.11 ผลการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 แบบเขย่าในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

GLU คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 180 ดาลตัน

PA 15 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 15 นาที เป็นแหล่งคาร์บอน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 8856 ดาลตัน

PA 30 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 30 นาที เป็นแหล่งคาร์บอน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 5147 ดาลตัน

PAG 180 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 60 นาที และกลูโคอะไมเลสเป็นเวลา 120 นาที เป็นแหล่งคาร์บอน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1282 ดาลตัน

SA 15 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 15 นาทีเป็นแหล่งคาร์บอน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1819 ดาลตัน

SA 30 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 30 นาทีเป็นแหล่งคาร์บอน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 751 ดาลตัน

SAG 180 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสเป็นเวลา 60 นาที และกลูโคอะไมเลสเป็นเวลา 120 นาที เป็นแหล่งคาร์บอน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 436 ดาลตัน

จากรูปที่ 4.11 สามารถแบ่งได้เป็น 3 กรณี โดยกรณีแรกคือแหล่งคาร์บอนจากกลูโคสบริสุทธิ์ (GLU) พบว่า ในช่วงชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 48 จะมีการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบอย่างช้าๆ เนื่องจากในช่วงชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 48 เป็นช่วงที่เซลล์กำลังเจริญและยังมีจำนวนเซลล์ที่น้อยอยู่จึงทำให้มีการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำ และจากชั่วโมงที่ 48 ถึง ชั่วโมงที่ 96 จะมีการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เชื้อมีปริมาณเซลล์สูงสุด และมีอัตราการผลิตแซนแทนกัมที่สูงสุดเช่นกัน ดังนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงในระยะเวลานี้จึงคาดว่าถูกใช้ไปกับการสร้างแซนแทนกัมและกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ และจากชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 120 ปริมาณเซลล์ และปริมาณแซนแทนกัมไม่เพิ่มขึ้น เนื่องจากความหนืดที่เกิดขึ้นในน้ำหมักจะไปขัดขวางการแพร่ของอาหารและออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ และมีการสะสม metabolites หรือของเสียซึ่งจะไปยับยั้ง TCA cycle เป็นผลให้การผลิตแซนแทนกัมลดลง (Vashitz and Sheintuch, 1991) ซึ่งสอดคล้องกับ Rogovin และคณะ (1961)

กรณีที่ 2 เมื่อใช้ SAG 180, PAG 180, SA 30 และ SA 15 เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 เพื่อผลิตแซนแทนกัม ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 436, 751, 1282 และ 1819 ดาลตัน ซึ่งพบว่าไฮโดรไลเซททั้งหมดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุล 180 ดาลตัน ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ในการผลิตแซนแทนกัมและกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ซึ่งต้องใช้พลังงาน *X. campestris* TISTR 840 ได้พลังงานจากคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส (Asim et al., 1999) จากการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 โดยใช้ SAG 180 ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย เชื้อสามารถผลิตแซนแทนกัมได้ 13.47 กรัมต่อลิตร แต่ SA 15 ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากเชื้อผลิตแซนแทนกัมได้เพียง 8.94 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.11.ค) แสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนที่ใช้คาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยน้อยซึ่งมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุล 180 ดาลตัน มากซึ่งอาจมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอยู่มากกว่า ทำให้เซลล์มีพลังงานในการนำไปผลิตปริมาณแซนแทนกัมได้มากกว่าแหล่งคาร์บอนที่ใช้คาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยมาก เมื่อติดตามผลการเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 เป็นช่วงที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์และยังมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไม่มาก การลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์,การเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์และการเพิ่มขึ้นของปริมาณแซนแทนกัมในแหล่งคาร์บอนทั้ง 4 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 96 SAG 180 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 436 ดาลตัน มีการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า SA 15 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1819 ดาลตัน เนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยน้อยมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุล 180 ดาลตัน อยู่มากซึ่งอาจมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอยู่มากกว่า เชื้อจึงยังคงใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป จึงทำให้ผลิตแซน

แทนกัมในปริมาณมาก แต่ปริมาณเซลล์มีค่าคงที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อขึ้นกับปริมาณไนโตรเจนมากกว่าขึ้นกับแหล่งคาร์บอน (Moraine and Rogovin, 1966) และจากชั่วโมงที่ 96 ถึงชั่วโมงที่ 120 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงที่ทำให้ปริมาณแซนแทนกัมคงที่ เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตที่สามารถนำไปใช้ได้หมดลงเหลือคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 180 ดาลตัน มากเป็นผลให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ยังคงเหลือในน้ำหมักมาก

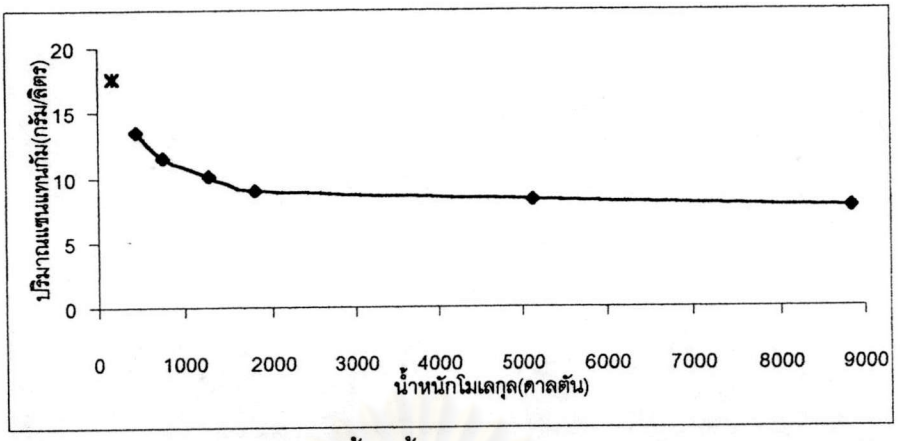
กรณีที่ 3 เมื่อใช้ PA 15 และ PA 30 เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 เพื่อผลิตแซนแทนกัม มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 8856 และ 5147 ดาลตัน ใน 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อมีการสร้างเซลล์และแซนแทนกัมใกล้เคียงกับที่ภาวะอื่นๆ แต่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งในการทดลองเป็นระบบปิดมีการควบคุมภาวะการเลี้ยงเชื้อให้เหมือนกันทั้ง 6 การทดลอง แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นในระบบการหมัก และหลังจาก 24 ชั่วโมงแรกปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มคงที่แสดงว่า อัตราการใช้น้ำตาลเท่ากับอัตราการผลิต แต่เนื่องจากแหล่งคาร์บอนมีคาร์โบไฮเดรตต่อกันเป็นสายยาวยากแก่การนำไปใช้เชื้อจึงต้องย่อยสายคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน จึงนำไปใช้ในการสร้างแซนแทนกัมและกิจกรรมต่างๆของเซลล์ได้ ซึ่งเชื้อก็ต้องใช้พลังงานในการย่อยคาร์โบไฮเดรตจึงทำให้มีสร้างแซนแทนกัมน้อยกว่าแหล่งคาร์บอนที่มีคาร์โบไฮเดรตสายสั้นๆ จากการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันพบว่า SAG 180 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ 436 ดาลตันเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักน้อยที่สุดเท่ากับ 6.49 กรัมต่อลิตร และให้ปริมาณแซนแทนกัมมากที่สุดเท่ากับ 13.47 กรัมต่อลิตร ซึ่งตรงข้ามกับ PA 15 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 8856 ดาลตัน เหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักเท่ากับ 13.72 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณแซนแทนกัมเพียง 7.67 กรัมต่อลิตรดังแสดงในตารางที่ 4.6 แต่ไฮโดรไลเซทจากทั้งกากมันและแป้งมันสำปะหลังให้ปริมาณเซลล์ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติแหล่งคาร์บอนจาก SAG 180, PAG 180, SA 30 และ SA 15 ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตอนเริ่มต้นเท่ากับ 27.44, 24.73, 24.16 และ 21.23 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จะเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 6.49, 10.04, 8.63 และ 11.78 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ภาวะปกติเซลล์ควรจะมีการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกันดังนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักชั่วโมงที่ 120 ควรจะเรียงลำดับเช่นเดียวกับตอนเริ่มต้นคือจากมากไปน้อย แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักของชั่วโมงที่ 120 เรียงจากน้อยไปมาก ซึ่งตรงข้ามกัน แสดงให้เห็นว่าอาจจะมีการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นระหว่างการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับกรณีที่ 3 ที่พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 4.6 ปริมาณเซลล์ ปริมาณแซนแทนกัม และ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ชั่วโมงที่ 120

ไฮโดรไลเซท	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (ดาลตัน)	น้ำหนักแห้งของเซลล์ (g/l)	ปริมาณแซนแทนกัม (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมัก(g/l)
PA 15	8856	$2.93^{b} \pm 0.26$	$7.67^{g} \pm 0.24$	$13.72^{a} \pm 0.34$
PA 30	5147	$2.93^{b} \pm 0.20$	$8.15^{f} \pm 0.20$	$13.18^{b} \pm 0.23$
PAG 180	1282	$3.07^{b} \pm 0.27$	$10.08^{d} \pm 0.30$	$10.04^{d} \pm 0.27$
SA 15	1819	$2.94^{b} \pm 0.16$	$8.94^{e} \pm 0.16$	$11.78^{c} \pm 0.14$
SA 30	751	$3.14^{b} \pm 0.13$	$11.43^{c} \pm 0.19$	$8.63^{e} \pm 0.39$
SAG 180	436	$3.28^{b} \pm 0.25$	$13.47^{b} \pm 0.15$	$6.49^{f} \pm 0.17$
GLU	180	$3.79^{a} \pm 0.19$	$17.62^{a} \pm 0.10$	$3.26^{g} \pm 0.10$

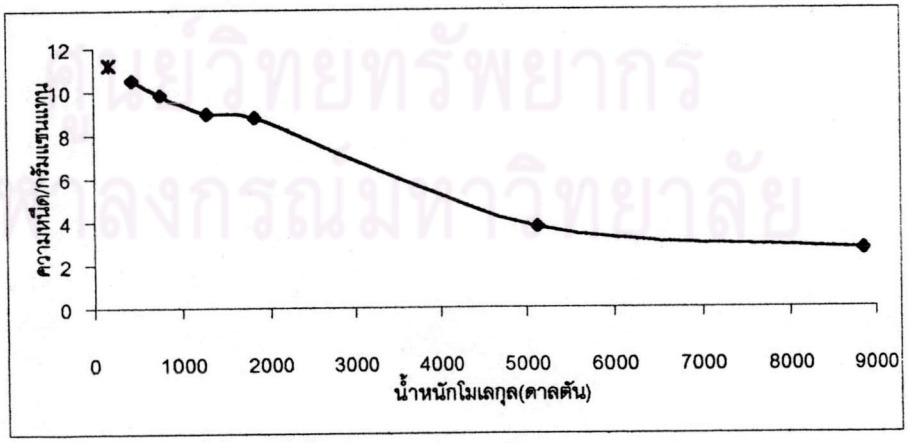
a,b,..,g ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เนื่องจากกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆของเซลล์และผลิตแซนแทนกัม(Pettitt,1978) ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสในปริมาณที่มากหรือคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะถูกนำไปใช้ในกิจกรรมของเซลล์ และผลิตแซนแทนกัมได้มากกว่าแหล่งคาร์บอนที่มีคาร์โบไฮเดรตน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแซนแทนกัมที่ได้เมื่อสิ้นสุดการหมักกับน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยที่มีในไฮโดรไลเซทดังแสดงในรูปที่ 4.12 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 8856, 5147, 1282, 1819, 751, 436 และ 180 ดาลตัน ให้ปริมาณแซนแทนกัมเท่ากับ 7.68, 8.16, 10.08, 8.94, 11.43, 13.47 และ 17.63 กรัมต่อลิตรตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า แหล่งคาร์บอนที่มีโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตตั้งแต่ 2,000 ดาลตันขึ้นไปจะให้ปริมาณแซนแทนกัมที่ใกล้เคียงกันในปริมาณที่น้อย เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากเป็นแหล่งคาร์บอนที่เซลล์จะนำไปใช้ในทันทีไม่ได้ต้องผลิตเอนไซม์มาย่อยให้มีน้ำหนักโมเลกุลเล็กก่อน แต่แหล่งคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตที่น้อยเซลล์จะนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ได้ทันทีทำให้ได้ปริมาณแซนแทนกัมมาก แสดงว่าคาร์โบไฮเดรตน้ำหนักโมเลกุลน้อยมีผลต่อปริมาณแซนแทนกัมที่ผลิตได้



รูปที่ 4.12 ปริมาณแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 แบบเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่างกัน

ความหนืดของแซนแทนกัมเป็นสมบัติที่สำคัญของกัมชนิดนี้ โดยที่แซนแทนกัมมีความคงตัวของความหนืดแม้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ค่าความเป็นกรด-ด่าง และ ความเข้มข้นของเกลือในสารละลาย ซึ่งความหนืดของสารละลายแซนแทนกัมเป็นค่าพื้นฐานที่ใช้ในการบอกสมบัติของแซนแทนกัม (Rock, 1971) ความหนืดต่อปริมาณแซนแทนกัมจากการหมักในภาวะต่างๆ แสดงในรูปที่ 4.13 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 8856, 5147, 1282, 1819, 751, 436 และ 180 ดาลตัน ให้ความหนืดต่อปริมาณแซนแทนกัมเท่ากับ 2.68, 3.72, 8.97, 8.82, 9.86, 10.5 และ 11.26 เซนติพอยส์ต่อกรัมแซนแทน แสดงว่าในปริมาณแซนแทนกัมที่เท่ากัน แหล่งคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะผลิตแซนแทนกัมที่มีความหนืดมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ธันยาภรณ์ นาวินวรรณ (2542)



รูปที่ 4.13 ความหนืดของแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 แบบเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่างกัน

4.4 ผลของการผลิตแซนแทนกัมแบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 5 ลิตร

4.4.1 ผลของอัตราการเจือจาง

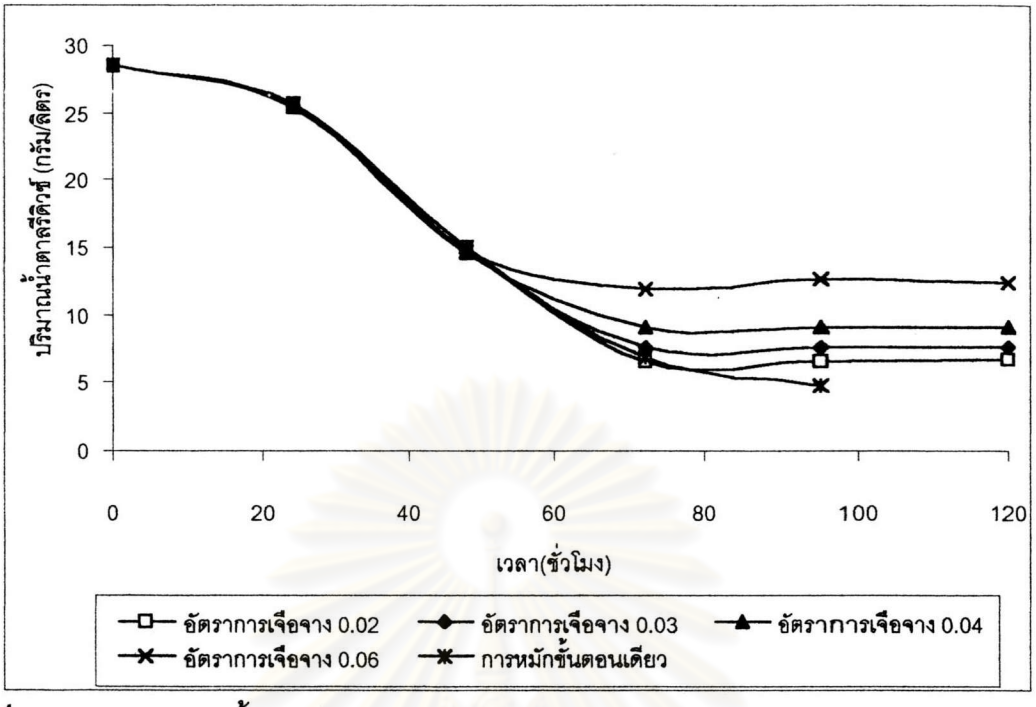
เนื่องจากระยะเวลาในการหมักนานขึ้น เซลล์ได้ใช้สารอาหารไปกับกิจกรรมต่างๆของเซลล์ทำให้ปริมาณอาหารน้อยลง และความหนืดที่เกิดจากการสะสมของแซนแทนกัมในน้ำหมักทำให้ปริมาณออกซิเจนและอาหารแพร่เข้าเซลล์ได้ยากขึ้น ซึ่งออกซิเจนเป็นสารสำคัญที่ทำให้เกิดพลังงานในการนำปผลิตแซนแทนกัม เมื่อเซลล์ไม่มีออกซิเจนพลังงานที่ใช้ในการผิตแซนแทนกัมจึงน้อยลง ปริมาณแซนแทนกัมจึงได้น้อยลงตามไปด้วย ดังนั้นการหมักแบบต่อเนื่องซึ่งมีการเจือจางน้ำหมักด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทำให้มีน้ำหมักมีความหนืดน้อยออกซิเจนจึงแพร่เข้าเซลล์ได้มากจึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกที่ทำให้ได้แซนแทนกัมที่มีปริมาณ และความหนืดสูง จากผลการทดลองในข้อ 4.3 แหล่งคาร์บอนจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยแอลฟา อะไมเลส 60 นาที ต่อด้วย กลูโคอะไมเลส 120 นาที ที่ให้ผลผลิต และ ความหนืดของแซนแทนกัมที่ได้สูงสุด ถูกเลือกเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักแซนแทนกัมแบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ลิตร การหมักแบบต่อเนื่อง เป็นการเจือจางน้ำหมักที่มีเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์ ที่อัตราการเจือจางที่เหมาะสมจะได้ผลิตภัณฑ์สูงสุดในระบบของการหมักแบบต่อเนื่อง ซึ่งอัตราการเจือจางหมายถึง อัตราการไหลของอาหาร(ปริมาตรน้ำหมักต่อเวลาที่ไหลผ่านถังหมัก หรือลิตรต่อชั่วโมง)ต่อปริมาตรน้ำหมักในถังหมัก(ปริมาตรน้ำหมัก หรือลิตร) มีหน่วยเป็น ต่อเวลาที่ไหลผ่านถังหมัก หรือ ต่อชั่วโมง และอัตราการเจริญจำเพาะหมายถึง ค่าการเจริญจำเพาะของเชื้อในภาวะเลี้ยงภาวะหนึ่งต่อช่วงเวลาหนึ่ง ซึ่งหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะได้จากการหมักแบบขั้นตอนเดียวในถังหมักโดยใช้แหล่งคาร์บอนจากแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยแอลฟา อะไมเลส 60 นาทีต่อด้วยกลูโคอะไมเลส 120 นาที เลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2 ลิตร ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm. ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0พบว่า ได้ปริมาณแซนแทนกัมเท่ากับ 19.41 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.034 ต่อชั่วโมง จากนั้นแปรค่าอัตราการเจือจางเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องโดยแปรอัตราการเจือจางในอัตรา 0.02 0.03 0.04 และ 0.06 ต่อชั่วโมง ติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์, การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแซนแทนกัมที่เกิดขึ้น พบว่า ที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง จะให้ปริมาณเซลล์, ปริมาณแซนแทนกัม และ การใช้น้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด ดังรูปที่ 4.14 เนื่องจากอัตราการเจือจางที่สูง เซลล์จะถูก wash out (ชะล้าง) ออกไปเป็นจำนวนมาก ถ้าอัตราเจือจางสูงกว่าอัตราการเจริญจำเพาะจะทำให้ปริมาณเซลล์ในถังหมักมีจำนวนต่ำลงเนื่องจากเซลล์เจริญไม่ทัน การใช้อาหารและการผลิตแซนแทนกัมจะต่ำลงตามไปด้วย จากการทดลอง

แปรค่าอัตราการเจือจางต่างๆได้ปริมาณแซนแทนกัมต่ออัตราการเจือจางแสดงในรูปที่ 4.15 อัตราการเจือจางที่ 0.02 ต่อชั่วโมง ให้ปริมาณแซนแทนกัมสูงสุดเท่ากับ 9.58 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.7 ในการหมักแบบต่อเนื่องอัตราการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้นในระบบสามารถแสดงได้ด้วยสมการ

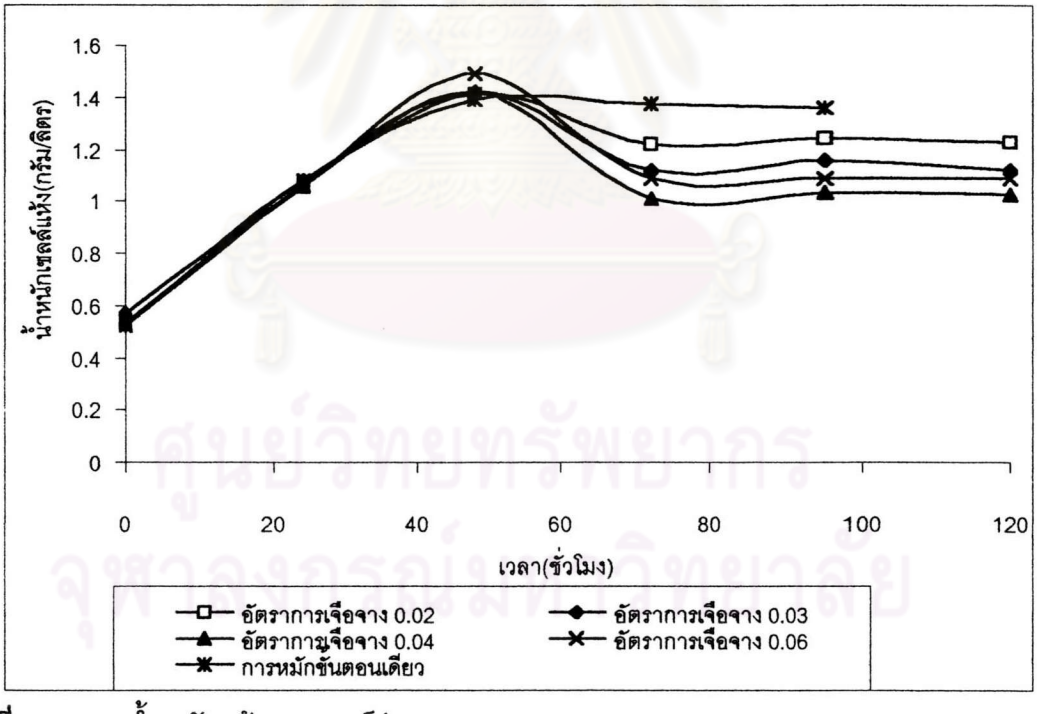
$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX$$

ในที่นี้ μ เท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะ D เท่ากับอัตราการเจือจาง จะเห็นได้ว่าภาวะคงที่ ปริมาณเซลล์คงที่ จะเกิดขึ้นเมื่อ $\mu = D$ ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมที่จะได้ปริมาณเซลล์ในระบบมากที่สุด ซึ่งเป็นค่าทางทฤษฎี (Marison et al.,1988) จากการทดลองการหมักแบบขั้นตอนเดียวในถังหมักขนาด 5 ลิตรหาค่า μ ได้เท่ากับ 0.034 ต่อชั่วโมง(ภาคผนวก ข 4) ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าอัตราการเจือจางที่ให้ปริมาณแซนแทนกัมมากที่สุดในระบบต่อเนื่องที่ทำการทดลอง ที่ได้เท่ากับ 0.02 ต่อชั่วโมง แต่ในทางปฏิบัติอาจมีหลายสาเหตุที่ทำให้ค่าที่ได้คลาดเคลื่อนไป ซึ่งสอดคล้องกับ Roseiro et al.(1993) พบว่า อัตราการเจือจางที่เหมาะสมในการผลิตแซนแทนกัมเท่ากับ 0.05 ต่อชั่วโมง แต่อัตราการเจริญจำเพาะมีค่าอยู่ในช่วง 0.11 – 0.12 ต่อชั่วโมง

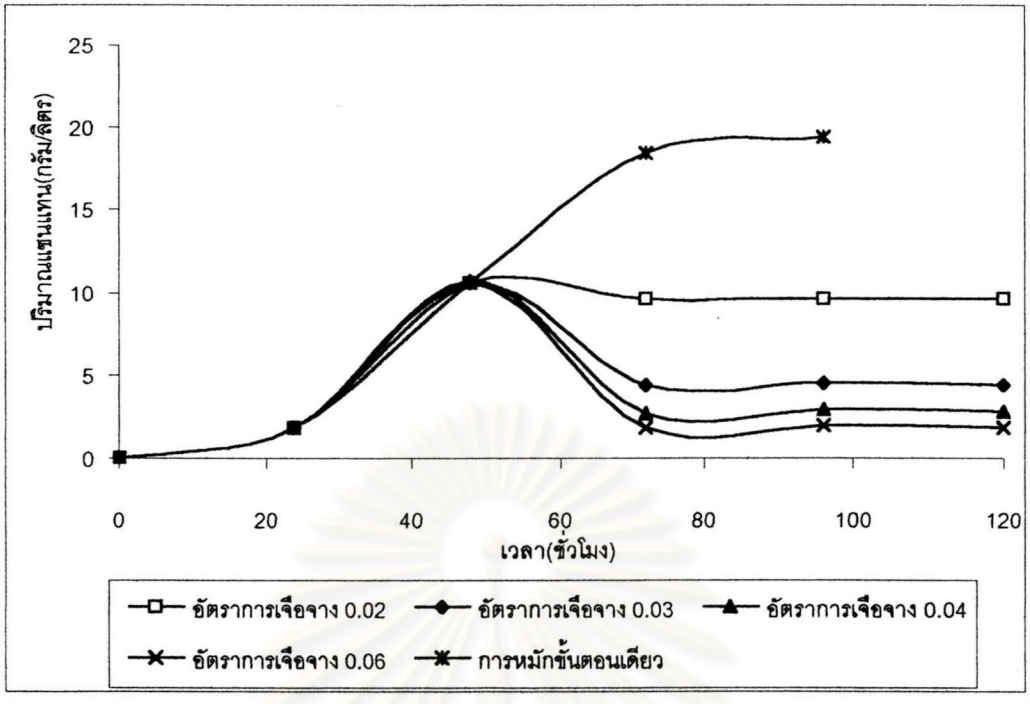
อัตราการผลิตแซนแทนกัมแบบต่อเนื่องที่ได้มีค่าเท่ากับ 0.053 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ต่ำกว่าอัตราการผลิตแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียวที่สภาวะและอาหารเลี้ยงเชื้อจากแหล่งคาร์บอนเดียวกันซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ภาคผนวก ข 5) แต่เมื่อพิจารณาคุณภาพของแซนแทนกัมพบว่า ความหนืดของแซนแทนกัมจากการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง ดีกว่าความหนืดของแซนแทนกัมจากการหมักแบบขั้นตอนเดียวถึง 1.5 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.16 ทั้งนี้เนื่องจากว่าในกระบวนการหมักแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียว ความหนืดของน้ำหมักที่เพิ่มขึ้นทำให้ออกซิเจนไม่สามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ ของเสียไม่สามารถแพร่ออกเกิดการสะสมของเสียภายในเซลล์ และเกิด metabolites ซึ่งจะไปยับยั้ง TCA cycle ที่เป็นกระบวนการสร้างแซนแทนกัม (Vashitz and Sheintuch, 1991) ดังนั้นการหมักแบบต่อเนื่องซึ่งมีการเติมอาหารใหม่และถ่ายน้ำหมักที่มีเซลล์ และสารต่างๆที่เซลล์ผลิตขึ้นออก ทำให้ปริมาณสารอาหารไม่ถูกจำกัด ลดปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมต่างๆของเซลล์ จึงทำให้ได้แซนแทนกัมที่มีความหนืดมากขึ้น



รูปที่ 4.14.ก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อเวลา



รูปที่ 4.14.ข น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อเวลา



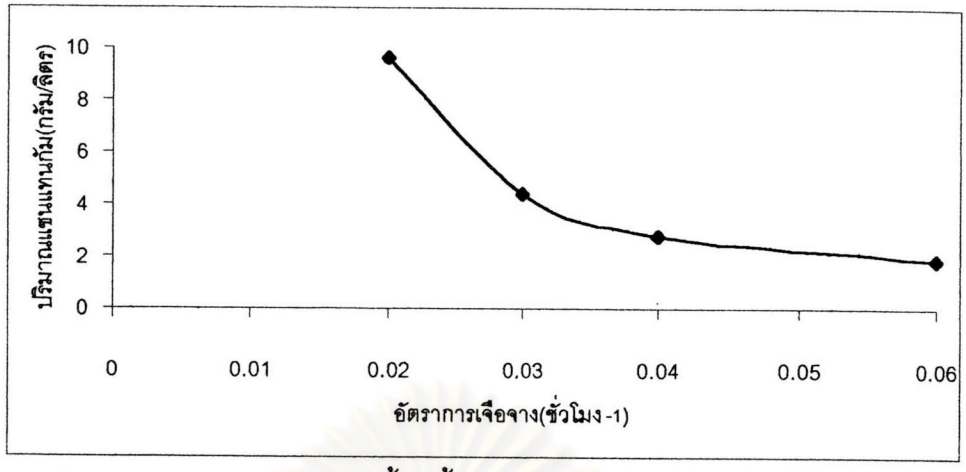
รูปที่ 4.14.ค ปริมาณแซนแทนกัมต่อเวลา

รูปที่ 4.14 ผลการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในการหมักแบบต่อเนื่อง ในถังหมักปริมาตร 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm. ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อัตราการเจือจางต่างๆ

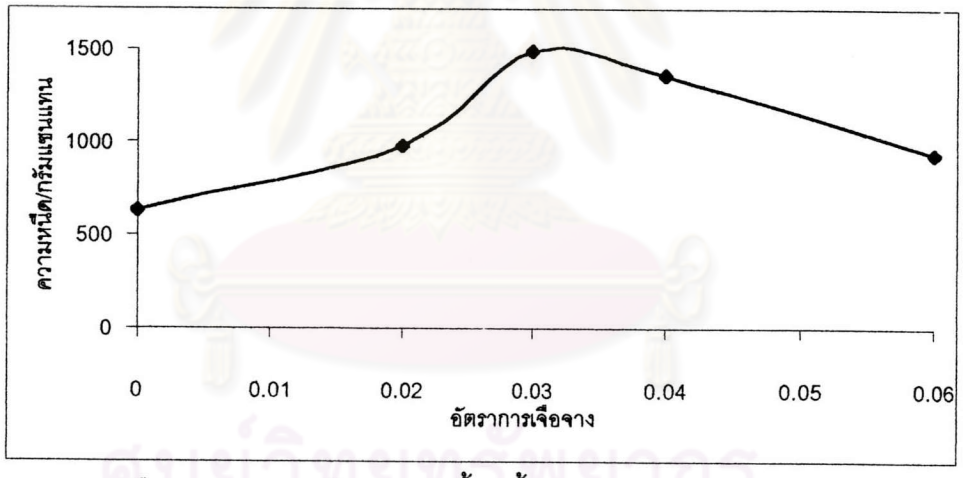
ตารางที่ 4.7 ปริมาณเซลล์ ปริมาณแซนแทนกัม และ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในการหมักแบบต่อเนื่อง ในถังหมักปริมาตร 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm. ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

อัตราการเจือจาง ($ชั่วโมง^{-1}$)	น้ำหนักแห้งของเซลล์ (g/l)	ปริมาณแซนแทนกัม (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมัก(g/l)
0.02	$1.22^{a} \pm 0.03$	$9.58^{d} \pm 0.11$	$6.68^{c} \pm 0.26$
0.03	$1.11^{b} \pm 0.02$	$4.35^{c} \pm 0.15$	$7.49^{c} \pm 0.37$
0.04	$1.13^{bc} \pm 0.05$	$2.75^{b} \pm 0.19$	$8.99^{b} \pm 0.35$
0.06	$1.09^{c} \pm 0.04$	$1.87^{a} \pm 0.20$	$12.27^{a} \pm 0.65$

a,b,c,d ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.15 ปริมาณแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในการหมักแบบต่อเนื่อง ในถังหมักปริมาตร 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm. ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อัตราการเจือจางต่างๆ



รูปที่ 4.16 ความหนืดของแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในการหมักแบบต่อเนื่อง ในถังหมักปริมาตร 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm. ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อัตราการเจือจางต่างๆ

4.4.2 ผลของอุณหภูมิในการผลิตแซนแทนกัม

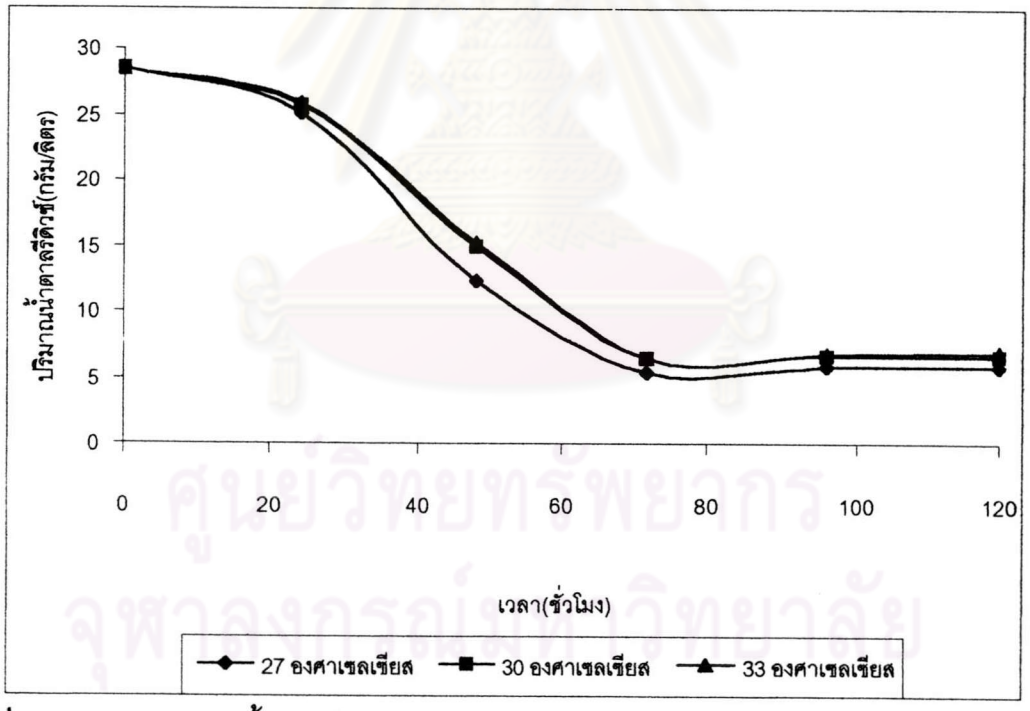
จากผลการทดลองในข้อ 4.4.1 ความหนืดของแซนแทนกัมที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง ต่ำกว่าที่อัตราการเจือจางอื่นๆ แต่อัตราการผลิตแซนแทนกัมสูงกว่าที่อัตราการเจือจาง 0.03 ต่อชั่วโมง และ 0.04 ต่อชั่วโมง จึงเลือกอัตราการเจือจางที่ 0.02 ต่อชั่วโมง มาทำการทดลองเพื่อปรับปรุงให้มีความหนืดมากขึ้น และอุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตแซนแทนกัมซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแซนแทนกัมและการเจริญของเชื้อนั้นไม่ใช่อุณหภูมิช่วงเดียวกันแต่การหมักแบบต่อเนื่องเป็นการรวมขั้นตอนของการเจริญและการผลิตแซนแทนกัมไว้ด้วยกันคือจะมีทั้งการเจริญและผลิตแซนแทนกัมไปพร้อมๆกันเนื่องจากมีการเจือจางน้ำหมักตลอดเวลาทำให้ต้องมีการสร้างเชื้อตลอดเวลา แซนแทนกัมถูกผลิตตลอดเวลาเช่นกัน จึงเลือกศึกษาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อปรับปรุงความหนืดของแซนแทนกัมที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง และศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตแซนแทนกัมแบบต่อเนื่อง โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักเป็น 27, 30 และ 33 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 27, 30 และ 33 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณแซนแทนไม่แตกต่างกันซึ่งเท่ากับ 9.5421, 9.5831 และ 9.6393 กรัมต่อลิตร ตามลำดับดังตารางที่ 4.8 แต่ความหนืดของแซนแทนกัมที่ได้จากทุกอุณหภูมิของการทดลองนี้ยังต่ำกว่าความหนืดของแซนแทนกัมที่อัตราการเจือจาง 0.03 และ 0.04 ต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้พบว่าที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส มีปริมาณเซลล์ และการเจริญมากกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆ อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสจึงเหมาะสมสำหรับการเจริญของเซลล์ ซึ่งเป็นผลให้มีการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากตามไปด้วยดังการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่แสดงในรูปที่ 4.17 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shu และ Yang(1990) พบว่า ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 24 ถึง 27 องศาเซลเซียสจะเหมาะกับการเจริญของเชื้อ และช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 33 องศาเซลเซียสจะเหมาะกับการผลิตแซนแทนกัม ผลของปริมาณแซนแทนกัมในการหมักแบบต่อเนื่องกับอุณหภูมิแสดงในรูปที่ 4.18 ซึ่งเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณแซนแทนกัมเพิ่มตาม และให้ความหนืดต่อปริมาณแซนแทนกัมสูงขึ้นดังรูปที่ 4.19 ซึ่งพบว่าความหนืดของแซนแทนกัมยังต่ำกว่าแซนแทนกัมที่อัตราการเจือจาง 0.03 ต่อชั่วโมง แต่ทำให้ทราบว่าถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียสจะทำให้ความหนืดของแซนแทนกัมลดลงอย่างรวดเร็ว

ตารางที่ 4.8 ปริมาณเซลล์ ปริมาณแซนแทนกัม และ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในการหมักแบบต่อเนื่อง ในถังหมักปริมาตร 2 ลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm. ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

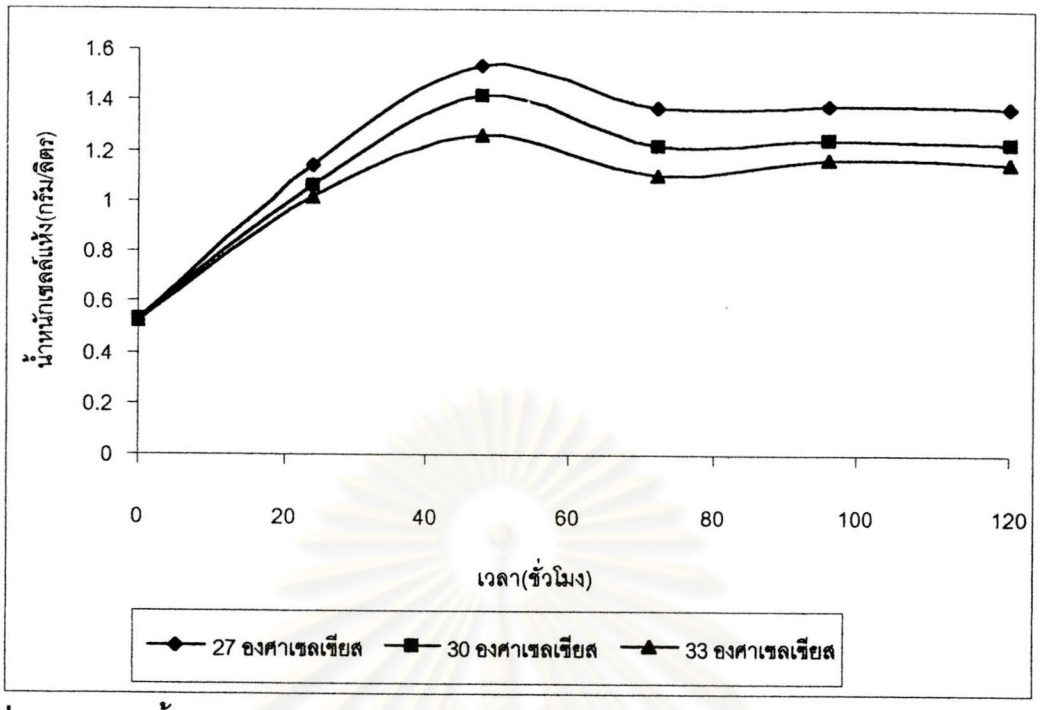
อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	น้ำหนักแห้งของเซลล์ (g/l)	ปริมาณแซนแทนกัม (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมัก(g/l)
27	$1.37^{a} \pm 0.03$	$9.54^{ns} \pm 0.12$	$5.87^{b} \pm 0.56$
30	$1.22^{b} \pm 0.02$	$9.62^{ns} \pm 0.15$	$6.68^{a} \pm 0.24$
33	$1.14^{c} \pm 0.04$	$9.63^{ns} \pm 0.16$	$6.86^{a} \pm 0.34$

a,b,c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

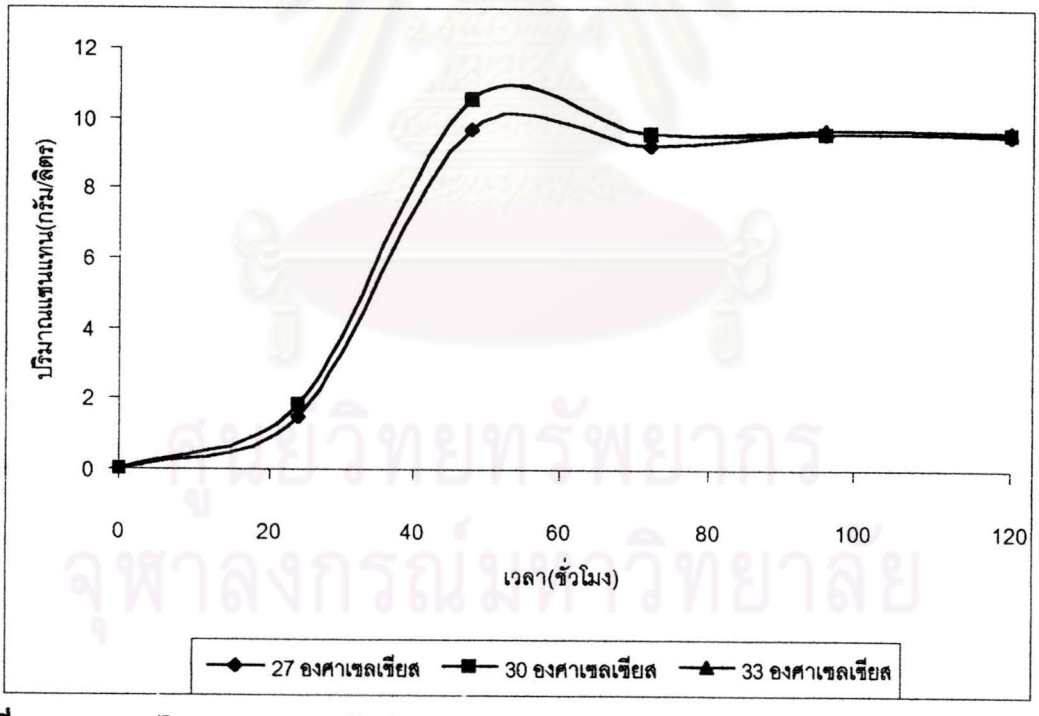
ns ตัวเลขที่มีอักษรกำกับจากแถวตั้งเดียวกัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)



รูปที่ 4.17.ก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อเวลา



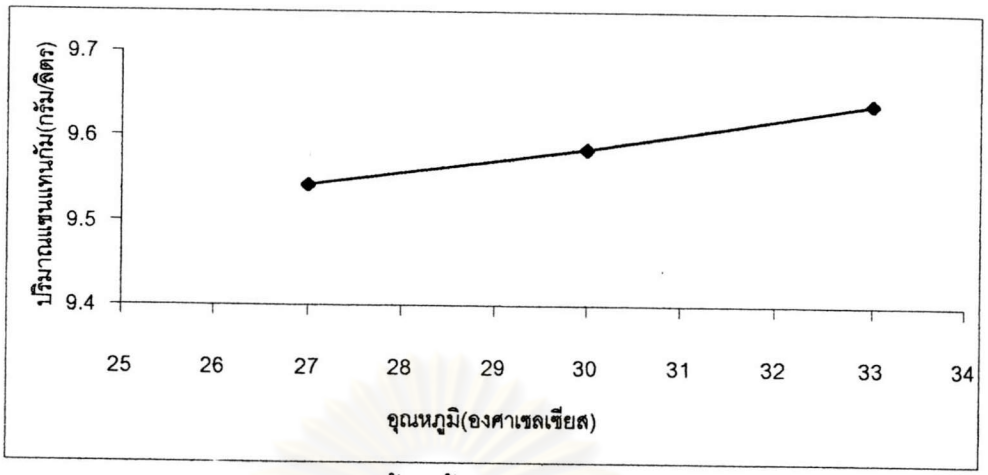
รูปที่ 4.17.ข น้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อเวลา



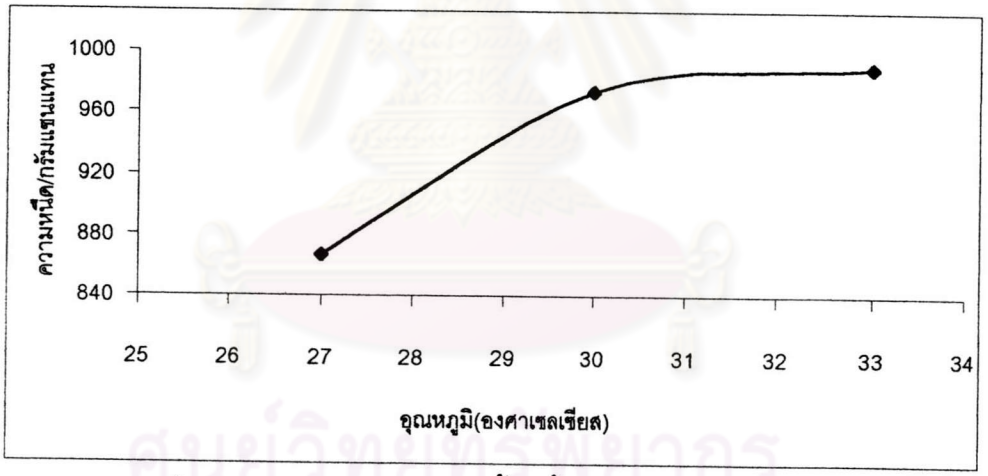
รูปที่ 4.17.ค ปริมาณแซนแทนกัมต่อเวลา

รูปที่ 4.17 ผลการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักปริมาตร 5 ลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง$^{-1}$ อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm. ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่างกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.18 ปริมาณแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักปริมาตร 5 ลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm. ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่างกัน



รูปที่ 4.19 ความหนืดของแซนแทนกัมจากการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักปริมาตร 5 ลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm. ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่างกัน