

การผลิตแทนแทนกัมจากไฮโดรไลเซตของแป้งมันสำปะหลังโดยใช้การหมักแบบป้อนเป็นช่วง



นางสาวสายศิริ ศิลปวุฒิ

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-3153-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF XANTHAN GUM FROM CASSAVA STARCH HYDROLYSATE  
BY FED BATCH FERMENTATION

Miss Saisiri Silwuti

สถาบันวิทยบริการ

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-3153-1

|                      |   |
|----------------------|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์    | การผลิตแซนแทนกัมจากไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลังโดยใช้การหมักแบบปั่นเป็นช่วง |
| โดย                  | นางสาว สายศิริ ศิลป์วุฒิ  |
| สาขาวิชา             | เทคโนโลยีทางอาหาร   |
| อาจารย์ที่ปรึกษา     | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร                                    |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | อาจารย์ ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช  |

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคส์ตฤศาสน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(อาจารย์ ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช)

..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. ชิดพงศ์ ประดิษฐ์สุวรรณ)

สายศิริ ศิลปวุฒิ : การผลิตแซนแทนกัมจากไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลังโดยใช้การหมักแบบป้อนเป็นช่วง (PRODUCTION OF XANTHAN GUM FROM CASSAVA STARCH HYDROLYSATE BY FED BATCH FERMENTATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สุเมธ ตันตระเธียร, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อ.ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช 110 หน้า ISBN 974-17-3153-1

ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Xanthomonas campestris* TISTR 840 เพื่อใช้ในการผลิตแซนแทนกัม โดยย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 7 % ด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส pH 6 อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และกลูโคอะไมเลสความเข้มข้น 1 % อุณหภูมิ 60 °C pH 4.1-4.3 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงตามลำดับ ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้น 55 - 60 g/l มีค่า DE 80 จากนั้นทำการศึกษผลของความเร็วยกในการกวนให้อากาศของไบฟัดโดยการหมักแซนแทนแบบขั้นตอนเดียวในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใช้อัตราส่วน C:N เริ่มต้นเท่ากับ 30:1 พบว่าการกวนให้อากาศของไบฟัดโดยใช้อัตราเร็ว 200 rpm ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-24 อัตราเร็ว 600 rpm ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24-48 และอัตราเร็ว 700 rpm ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48-72 สามารถใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงถึง 80.60 % น้ำหมักมีความหนืด 13,860 cp และให้ crude xanthan สูงสุดเท่ากับ 2.23 % เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณแซนแทนจึงทำการศึกษการหมักแบบ 2 ขั้นตอนด้วยการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ 200 rpm โดยขั้นแรกศึกษาอัตราส่วน C:N ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่อัตรา ส่วน C:N เท่ากับ 10:1 ให้ % cell dry weight สูงที่สุดเท่ากับ 0.129 % และขั้นที่ 2 ศึกษา C:N ที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 94 ชั่วโมง พบว่าที่อัตราส่วน C:N เท่ากับ 30:1 ให้ crude xanthan เท่ากับ 3.18 % และน้ำหมักมีความหนืดสูงสุดเท่ากับ 132,725 cp จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาใช้ในการหมักแบบ 2 ขั้นตอนในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุม pH เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30°C อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm มีการกวนให้อากาศ 200 rpm ที่ 24 ชั่วโมงแรก 600 rpm ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24-48 และ 700 rpm ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48-63 โดยใช้อัตราส่วน C:N เท่ากับ 10:1 ในตอนเริ่มต้นการหมักเพื่อกระตุ้นการเจริญของเซลล์และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 39 จึงปรับค่าอัตราส่วน C:N เป็น 30:1 พบว่าใช้เวลาในการหมักเพียง 63 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับการหมักแบบขั้นตอนเดียวซึ่งใช้เวลา 72 ชั่วโมงและยังให้ crude xanthan เท่ากับ 3.50 % และน้ำหมักมีความหนืด 14,300 cp โดย crude xanthan ที่ผลิตได้จากการทดลองในถังหมักทุกสภาวะมีคุณสมบัติในเรื่องของความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ค่า pH และความเข้มข้นของสารละลายเกลือและแสดงความเป็น pseudoplastic ได้เป็นอย่างดีแต่ความหนืดที่ได้มีค่าน้อยกว่าแซนแทนกัมเกรดอาหาร นอกจากนี้ crude xanthan ที่ได้จากการทดลองมีปริมาณ total carbohydrate และปริมาณ total protein ใกล้เคียงกับแซนแทนกัมเกรดอาหารและมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าแต่มี % total nitrogen ต่ำกว่าแซนแทนกัมเกรดอาหาร ส่วน MW เฉลี่ยของ crude xanthan มีองค์ประกอบของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำอยู่เป็นจำนวนมากกว่าที่พบในแซนแทนกัมเกรดอาหาร

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อ.....  
 สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
 ปีการศึกษา...2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4272427523 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD : XANTHAN GUM, CASSAVA STARCH, HYDROLYSATE, *Xanthomonas campestris*

SAISIRI SILWUTI: PRODUCTION OF XANTHAN GUM FROM CASSAVA STARCH  
 HYDROLYSATE BY FED BATCH FERMENTATION. THESIS ADVISOR : ASST.  
 PROF. SUMATE TANTRATIAN, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : THANACHAN  
 MAHAWANICH, Ph.D. 110 pp. ISBN 974-17-3153-1

The hydrolysate of cassava starch was used as a carbon source for *Xanthomonas campestris* TISTR 840 in xanthan gum production. The 7 % of cassava starch was hydrolysed into glucose solution by 1 % alpha – amylase at pH 6, 80 °C for 1 hour and then followed with glucoamylase at pH 4.1 - 4.3, 60 °C for 2 hours. The hydrolysate contained reducing sugar about 55 – 60 g/l and DE 80. The fermentation with various agitation conditions were studied and done in a 5 liter fermenter vessel with hydrolysate liquid medium contained C:N ratio of 30:1 for 72 hours. It was found that the 200 rpm at the starting fermentation, 600 rpm at 24 – 48 hours and then shifted to 700 rpm gave the highest amount of crude xanthan of 2.23 %. The *X. campestris* TISTR 840 consumed 80% of sugar in the system. The viscosity of culture broth was 13,860 centipoise. To increase the production of xanthan, two-stage fermentation was applied. The studying in shake flask fermentation was showed that the first stage of cell mass production was achieved with medium contained C:N ratio of 10:1, shaken at 200 rpm for 48 hours. This condition provided highest cell mass of 0.129 % (w/v) dry weight. The second stage was aimed to produce xanthan. It was found that the medium contained C:N ratio of 30:1 and shaken at 200 rpm for 94 hours produced the highest crude xanthan 3.18 % (w/v). The viscosity of culture broth was 132.725 centipoise. In fermenter, the fermentation condition was set up as the medium contained C:N ratio of 10:1 agitated at 200 rpm for 24 hours. The second stage was done by addition of hydrolysate in the fermenter until the C:N reached 30:1 at 39 hours and continue fermentation under the condition of 600 rpm at 24 – 48 hours, then shifted to 700 rpm until reached at 63 hours. After the fermentation complete, the crude xanthan of 3.50 % was extracted and the viscosity of broth was 14,300 centipoise. The crude xanthans from two-stage fermentation in 5 liter fermenter were showed the same properties as food grade xanthan gum about pseudoplastic and consistency for various temperature, pH and salt concentration. The crude xanthans compounded of the total carbohydrate and total protein closed to food grade xanthan gum while higher in reducing sugar but less than total nitrogen. The crude xanthans were found to lower an amount of high molecular weight molecule, which showed less viscosity than the food grade xanthan gum.

Department.....FOOD TECHNOLOGY.....Student's signature.....  
 Field of study.....FOOD TECHNOLOGY.....Advisor's signature.....  
 Academic year...2002..... Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญาโทบริหารธุรกิจและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จอย่างสมบูรณ์ได้โดยได้รับความช่วยเหลืออย่างดีจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวัจนศาสตร์ ประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และอาจารย์ ดร. ชิตพงศ์ ประดิษฐ์สุวรรณ กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณบริษัทอีสเอเชียติก (ประเทศไทย) ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณคุณพรณทิพย์ เทียนทอง ที่ให้ความอนุเคราะห์แซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารโดยเฉพาะคุณสำเร็จ จันทรนิยม ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกการใช้ห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องสาวและญาติผู้ใหญ่ ที่เป็นกำลังใจสำคัญอย่างยิ่งในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

## หน้า

|  |    |
|--|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....   | ง  |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....  | จ  |
| กิตติกรรมประกาศ.....   | ฉ  |
| สารบัญ.....  | ช  |
| สารบัญตาราง.....   | ญ  |
| สารบัญรูป.....   | ฐ  |
| บทที่  |    |
| 1    บทนำ.....   | 1  |
| 2    วารสารปริทัศน์.....   | 2  |
| 2.1   ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง.....  | 2  |
| 2.2   กัม (Gum).....   | 9  |
| 2.3   แชนแทนกัม (Xanthan Gum).....   | 11 |
| 2.4   จุลินทรีย์สร้างแชนแทนกัม.....  | 13 |
| 2.5   โครงสร้างแชนแทนกัม.....  | 14 |
| 2.6   การผลิตแชนแทนกัม.....  | 18 |
| 2.7   สมบัติทางกายภาพของแชนแทนกัม.....   | 19 |
| 2.8   คุณสมบัติโดยทั่วไปของแชนแทนกัม.....  | 20 |
| 2.9   ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแชนแทนกัม.....  | 22 |
| 3    วิธีการทดลอง.....   | 28 |
| 3.1   วัตถุประสงค์.....  | 28 |
| 3.2   อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....   | 28 |
| 3.3   แบบที่เรียกใช้ในการทดลอง.....  | 31 |
| 3.4   การเก็บรักษาเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง.....  | 31 |
| 3.5   การเตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์.....   | 31 |
| 3.6   ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง<br>ด้วยเอนไซม์โดยใช้วิธี Gel Permeation Chromatography ..... | 32 |

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่

|      |   |    |
|------|---|----|
| 3.7  | ศึกษาผลของอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดต่อ<br>กระบวนการผลิตแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียวในถังหมัก.....                       | 32 |
| 3.8  | ศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญ<br>และการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ <i>X. campestris</i> TISTR 840..... | 33 |
| 3.9  | ศึกษากระบวนการผลิตแซนแทนกัมโดยการหมักแบบป้อนเป็นช่วง<br>แบบ 2 ขั้นตอน.....  | 34 |
| 3.10 | วิเคราะห์คุณสมบัติของแซนแทนกัม.....   | 35 |
| 3.11 | วิเคราะห์องค์ประกอบของแซนแทนกัม.....  | 36 |
| 4    | ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....   | 37 |
| 4.1  | หาน้ำหนักโมเลกุลของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง<br>ด้วยเอนไซม์โดยใช้วิธี Gel Permeation Chromatography.....    | 37 |
| 4.2  | ผลของอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดต่อกระบวนการผลิต<br>แซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียวในถังหมัก.....                            | 39 |
| 4.3  | ศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและ<br>การผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ <i>X. campestris</i> TISTR 840..... | 48 |
| 4.4  | ศึกษากระบวนการผลิตแซนแทนกัมโดยการหมักชนิดป้อนเป็นช่วง<br>แบบ 2 ขั้นตอน.....   | 59 |
| 4.5  | วิเคราะห์คุณสมบัติของแซนแทนกัม.....   | 65 |
| 4.6  | วิเคราะห์องค์ประกอบของแซนแทนกัม.....  | 71 |
| 5    | สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....  | 78 |
| 5.1  | สรุปผลการทดลอง.....   | 78 |
| 5.2  | ข้อเสนอแนะ.....   | 80 |
|      | รายการอ้างอิง.....  | 82 |
|      | ภาคผนวก.....  | 90 |
|      | ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....  | 91 |
|      | ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์.....  | 92 |



สารบัญ (ต่อ)

หน้า

|       |                                 |                                    |
|-------|---------------------------------|------------------------------------|
| บทที่ |                                 |                                    |
|       | ภาคผนวก ค                       | ข้อมูลผลิตภัณฑ์.....98             |
|       | ภาคผนวก ง                       | การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....106 |
|       | ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... | 110                                |



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

หน้า

## ตารางที่

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1  | คุณสมบัติโดยรวมของแป้งมันสำปะหลัง.....  | 5  |
| 2  | องค์ประกอบทางเคมีของแป้งชนิดต่าง ๆ .....  | 6  |
| 3  | มูลค่าการนำเข้ากัมชนิดต่าง ๆ .....  | 10 |
| 4  | กัมจากสาหร่าย ฟีช และจุลินทรีย์.....  | 10 |
| 5  | ปริมาณการใช้และราคาของกัมชนิดต่าง ๆ.....  | 11 |
| 6  | การใช้แทนแทนกัมทางด้านอาหาร.....  | 12 |
| 7  | สมบัติทางกายภาพของแทนแทนกัมที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร.....   | 19 |
| 8  | ความคงตัวของความหนืดของสารละลายแทนแทนกัมในกรด-ด่าง<br>และเกลือชนิดต่าง ๆ .....  | 22 |
| 9  | น้ำหนักโมเลกุลของสารที่ออกมาที่ fraction number ต่าง ๆ ของ<br>สารละลายไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์.....   | 38 |
| 10 | % การใช้น้ำตาลรีดิวิตซ์เมื่อสิ้นสุดการหมักแบบขึ้นตอนเดียว<br>โดยใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศแบบต่าง ๆ.....  | 41 |
| 11 | % crude xanthan เมื่อสิ้นสุดการหมักแบบขึ้นตอนเดียวโดยใช้อัตราเร็ว<br>ในการกวนให้อากาศแบบต่าง ๆ.....   | 45 |
| 12 | % น้ำตาลรีดิวิตซ์ที่ใช้ไป % cell dry weight และความหนืดของน้ำหมัก<br>เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน<br>เท่ากับ 5:1 10:1 และ 15:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ<br>200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... | 51 |
| 13 | % น้ำตาลรีดิวิตซ์ที่ใช้ไปเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่<br>อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 30:1 และ 40:1<br>ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที<br>ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 94 ชั่วโมง.....   | 55 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่

14 % cell dry weight ความหนืดของน้ำหมัก และ % crude xanthan เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 30:1 และ 40:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 94 ชั่วโมง.....57

15 เปรียบเทียบ % crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบขั้นตอนเดียว และแบบ 2 ขั้นตอนโดยใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 3.....64

16 แสดงองค์ประกอบต่าง ๆ ของ crude xanthan ที่ได้จากการทดลอง ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์และสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร (Satiaxane™ CX 91) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์.....72

17 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ ขั้นตอนเดียวใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 1 และ 2 (B1 และ B2) crude xanthanที่ได้จากการหมักแบบ 2 ขั้นตอนใช้การกวนให้อากาศ แบบที่ 3 (T3) และแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91.....74

18 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % การใช้น้ำตาลรีดิวซ์เมื่อสิ้นสุดการหมักของ การหมักแบบขั้นตอนเดียวโดยแปรความเร็วรอบในการกวนให้อากาศเป็นแบบต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design.....106

19 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % crude xanthan เมื่อสิ้นสุดการหมักของการหมัก แบบขั้นตอนเดียวโดยแปรความเร็วรอบในการกวนให้อากาศเป็นแบบต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design.....106

20 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % น้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไปเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design.....107

## สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

### ตารางที่

- 21 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % cell dry weight เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้  
อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ  
30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง  
โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design.....107
- 22 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของความหนืดน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้  
อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ  
30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง  
โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design.....107
- 23 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % น้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดย  
ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30  
องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 94 ชั่วโมง  
โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design.....108
- 24 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % cell dry weight เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้  
อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ  
30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 94 ชั่วโมง  
โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design.....108
- 25 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของความหนืดของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้  
อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ  
30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 94 ชั่วโมง  
โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design.....108
- 26 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % crude xanthan เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้  
อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ  
30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 94 ชั่วโมง  
โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design.....109

## สารบัญรูป

หน้า

### รูปที่

|    |  |    |
|----|--|----|
| 1  | โครงสร้างของอะไมโลส.....   | 3  |
| 2  | โครงสร้างของอะไมโลเพกติน .....   | 4  |
| 3  | ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>X. campestris</i> .....  | 13 |
| 4  | ภาพถ่าย electron micrograph ของการสะสมแซนแทนกัมรอบเซลล์<br><i>X. campestris</i> เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง.....  | 15 |
| 5  | ภาพถ่าย electron micrograph ของแซนแทนกัมซึ่งหลุดออกจากเซลล์<br><i>X. campestris</i> ลงสู่น้ำหมักเมื่อมีการกวนให้อากาศ 400 รอบ/นาที .....   | 15 |
| 6  | โครงสร้างของแซนแทนกัม... ..  | 16 |
| 7  | การจัดเรียงตัวของโครงสร้างแซนแทนกัม.....   | 17 |
| 8  | กระบวนการผลิตแซนแทนกัม .....   | 18 |
| 9  | ความสัมพันธ์ระหว่าง fraction number กับปริมาณ total carbohydrate<br>ของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เมื่อผ่าน<br>การทำ Gel Permeation Chromatography.....   | 37 |
| 10 | ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่า O.D. ของน้ำหมัก เมื่อทำการหมักแบบ<br>ขั้นตอนเดียวในถังหมักปริมาตร 2 ลิตร โดยใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศ<br>แบบต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7<br>มีอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....  | 40 |
| 11 | ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ <i>X. campestris</i><br>TISTR 840 เมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวในถังหมักปริมาตร 2 ลิตร<br>โดยใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศแบบต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส<br>ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 มีอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... | 40 |
| 12 | ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักเมื่อทำการหมัก<br>แบบขั้นตอนเดียวในถังหมักปริมาตร 2 ลิตร โดยใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศ<br>แบบต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7<br>มีอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....                                | 42 |

## สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

### รูปที่

- 13 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความหนืดของน้ำหมักเมื่อทำการหมักแบบ  
ขั้นตอนเดียวในถังหมักปริมาตร 2 ลิตร โดยใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศ  
แบบต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7  
มีอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....42
- 14 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหมัก (DO)  
เมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวในถังหมักปริมาตร 2 ลิตร โดยใช้อัตราเร็วใน  
การกวนให้อากาศแบบต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็น  
กรด-ด่างเท่ากับ 7 มีอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....44
- 15 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับ ค่า O.D.ของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840  
เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหารที่มี C: N เท่ากับ 5:1 10:1 และ 15:1  
ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็น  
กรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง .....49
- 16 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับ ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *X. campestris*  
TISTR 840 เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหารที่มี C: N เท่ากับ 5:1 10:1 และ  
15:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็น  
กรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง .....49
- 17 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับ ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเมื่อ  
เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหารที่มี C: N เท่ากับ 5:1 10:1 และ 15:1  
ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที  
ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....50
- 18 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับ ค่า O.D. ของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840  
เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C:N เท่ากับ 20:1 30:1  
และ 40:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที  
ค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 94 ชั่วโมง.....53

## สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

### รูปที่

- 19 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่เปลี่ยนแปลงเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C:N เท่ากับ 20:1 30:1 และ 40:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 94 ชั่วโมง.....54
- 20 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำหมักเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C:N เท่ากับ 20:1 30:1 และ 40:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 94 ชั่วโมง.....55
- 21 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่า O.D. เมื่อทำการหมักแบบขั้นต่อนเดียว(batch) และแบบ 2 ขั้นต่อน (two-stage) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm. ใช้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศ 200 รอบต่อนาที (0-24 ชม.) 600 รอบต่อนาที (24-48 ชม.)และ 700 รอบต่อนาที (48-72 ชม.).....60
- 22 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการหมักแบบขั้นต่อนเดียว (batch) และแบบ 2 ขั้นต่อน (two-stage) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm .ใช้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศ 200 รอบต่อนาที (0-24 ชม.) 600 รอบต่อนาที (24-48 ชม.) และ 700 รอบต่อนาที (48-72 ชม.).....60
- 23 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักเมื่อทำการหมักแบบขั้นต่อนเดียว (batch) และแบบ 2 ขั้นต่อน (two-stage) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm. ใช้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศ 200 รอบต่อนาที (0-24 ชม.) 600 รอบต่อนาที (24-48 ชม.) และ 700 รอบต่อนาที (48-72 ชม.).....61

## สารบัญญรูป (ต่อ)

หน้า

## รูปที่

- 24 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความหนืดเมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียว (batch) และแบบ 2 ขั้นตอน (two - stage) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm. ใช้ความเร็ว รอบในการกวนให้อากาศ 200 รอบต่อนาที (0-24 ชม.) 600 รอบต่อนาที (24-48 ชม.) และ 700 รอบต่อนาที (48-72 ชม.) .....62
- 25 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ (DO) เมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียว (batch) และแบบ 2 ขั้นตอน (two - stage) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีค่า ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm .ใช้ความเร็วรอบ ในการกวนให้อากาศ 200 รอบต่อนาที (0-24 ชม.) 600 รอบต่อนาที (24-48 ชม.) และ 700 รอบต่อนาที (48-72 ชม.).....63
- 26 ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองและสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์.....65
- 27 ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของ สารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองและสารละลายแซนแทนกัม เกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์.....66
- 28 ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายเกลือ ต่อสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองและสารละลายแซนแทนกัม เกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์.....68
- 29 ความหนืดของสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองกับสารละลาย แซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....69
- 30 ความหนืดของสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองกับสารละลาย แซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ที่ shear rate ต่าง ๆ.....70
- 31 ลักษณะของน้ำหมักแซนแทนที่ได้เมื่อสิ้นสุดการหมัก.....73



## สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

### รูปที่

|    |  |    |
|----|--|----|
| 32 | ลักษณะของ crude xanthan ที่ผ่านการอบแห้งแล้วเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม<br>เกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91.....                   | 73 |
| 33 | เครื่อง fermenter รุ่น Biostat® B ขนาด 5 ลิตร ที่ใช้ในการทดลอง.....  | 75 |
| 34 | Chromatogram แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ crude xanthan (B1)<br>วิเคราะห์โดย Gel Permeation Chromatography.....                 | 96 |
| 35 | Chromatogram แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ crude xanthan (B2)<br>วิเคราะห์โดย Gel Permeation Chromatography.....                 | 96 |
| 36 | Chromatogram แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ crude xanthan (T3)<br>วิเคราะห์โดย Gel Permeation Chromatography.....                 | 97 |
| 37 | Chromatogram แสดงน้ำหนักโมเลกุลของแซนแทนกัมเกรดอาหาร<br>Satiaxane™ CX 91 วิเคราะห์โดย Gel Permeation Chromatography..... | 97 |

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 1

### บทนำ

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตแป้งมันสำปะหลังรายใหญ่ของโลก โดยประมาณร้อยละ 60 ของแป้งมันสำปะหลังที่ผลิตได้จะส่งออกไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ ส่วนผลผลิตอีกร้อยละ 40 จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังภายในประเทศ เช่น อุตสาหกรรมแป้งแปรรูปอุตสาหกรรมสารให้ความหวาน อุตสาหกรรมอาหารประเภทสาคู และอุตสาหกรรมผงชูรส เป็นต้น มีการคาดการณ์ความเจริญเติบโตของตลาดแป้งมันสำปะหลังภายในประเทศตั้งแต่ปี 2536 / 2537 เป็นต้นไป จะมีความเจริญเติบโตสูงโดยเฉลี่ยร้อยละ 8.4 ต่อปี อันเนื่องมาจากความต้องการใช้แป้งมันสำปะหลังภายในประเทศขยายตัวอย่างต่อเนื่องตามการเจริญเติบโตของเศรษฐกิจ (สมาคมการค้าแป้งมันสำปะหลังไทย, 2537) ดังนั้นการนำเอาแป้งมันสำปะหลังมาเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสบริสุทธิ์ในการผลิตแซนแทนกัมโดยการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำแป้งมันสำปะหลังไปใช้ให้หลากหลายยิ่งขึ้นและยังเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตแซนแทนกัมอีกด้วย

สิ่งหนึ่งที่เป็นข้อจำกัดที่สำคัญในกระบวนการหมักของแซนแทนคือค่าใช้จ่ายที่สูงในการผลิตเมื่อเปรียบเทียบกับโพลีเมอร์ (polymer) ที่ผลิตได้จากวัตถุดิบอื่น ๆ เช่น กัมที่ผลิตได้จากสาหร่าย หรือพืช ที่มีความคล้ายคลึงกัน (Moreno et al., 1998) จึงได้มีงานวิจัยที่นำเอาวัตถุดิบซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจำนวนมากจากการเกษตรมาย่อยให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารที่มีราคาถูกกว่าการใช้กลูโคสบริสุทธิ์ที่ใช้ในปัจจุบันและเนื่องจากกระบวนการผลิตแซนแทนกัมที่มีคุณภาพนั้นมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูงทำให้มีราคาแพงและยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นถ้าสามารถผลิตแซนแทนที่มีคุณภาพได้ในปริมาณสูงและลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตลงได้จะเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการผลิตแซนแทนกัมจากไฮโดรไลเซทซึ่งได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เมื่อทำการหมักแบบป้อนเป็นช่วงเพื่อเพิ่มปริมาณและคุณภาพของแซนแทนกัม

## บทที่ 2

### วารสารปริทัศน์

#### 2.1 ไฮโดรไลเซสของแป้งมันสำปะหลัง

การผลิตสารให้ความหวานครั้งแรกเริ่มในศตวรรษที่ 9 ที่ประเทศญี่ปุ่น โดยการใช้น้ำย่อยจากข้าวมอลต์ที่ย่อยแป้งจากหัว arrowroot จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1781 เป็นที่ทราบกันว่าแป้งสามารถย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) เพื่อใช้เป็นสารให้ความหวาน ในระหว่าง ค.ศ. 1880 ถึง 1920 ได้เริ่มมีการศึกษาสารให้ความหวานจากการย่อยแป้งด้วยกรดกันมาก โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า สตาร์ชซีรัป (starch syrup) ต่อมาเรียกผลิตภัณฑ์นี้ว่า กลูโคสซีรัป (glucose syrup) และในปี ค.ศ. 1833 ได้เริ่มสนใจการใช้เอนไซม์ (enzyme) ในการย่อยแป้งกันมากขึ้น เช่น ในปี ค.ศ. 1833 ได้มีการนำ diastase จากข้าวบาร์เลย์ที่กำลังงอก (malt) มาช่วยในการผลิตน้ำเชื่อมมอลโตส ต่อมาพบว่า diastase เป็นเอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟาอะไมเลสกับเบต้าอะไมเลส ซึ่งเอนไซม์สองตัวนี้มีคุณสมบัติในการย่อยต่างกัน (Frenchmann and Payen, 1833 cited in Dziejic and Kearsley, 1984) ในปี ค.ศ. 1896 ได้มีการใช้เอนไซม์ร่วมกันระหว่างเอนไซม์อะไมเลสกับกลูโคอะไมเลส พบว่าสามารถย่อยได้ค่าสมมูลเดกซ์โตรส (Dextrose Equivalent, DE) 65 และในปี ค.ศ. 1938 มีการพบเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากการเลี้ยงเชื้อราในรำข้าวและพบว่าสามารถนำรำข้าวที่มีเชื้อราไปใช้แทนข้าวมอลต์ในการผลิตแอลกอฮอล์ได้ (Hao, Fulmer and Underkofler, 1943 อ้างถึงใน อำนวย เรื่องกิจวณิชกุล, 2531) นอกจากนี้ Corman และ Langlykke (1948) อ้างถึงใน อำนวย เรื่องกิจวณิชกุล (2531) ได้ศึกษาปฏิกิริยาของกลูโคอะไมเลส พบว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อย มอลโตส เดกตริน และแป้งไปเป็นกลูโคสดีกว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส หลังจากปี ค.ศ. 1950 ได้มีการใช้เอนไซม์ในการย่อยแป้งกันอย่างแพร่หลาย Fuji และคณะ (1987) อ้างถึงใน กล้าณรงค์ ศิริรอดและคณะ (2540) พบว่าแอลฟาอะไมเลสมีความสามารถในการย่อยแป้งดิบต่ำกว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสแต่เมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันในการย่อยแป้งดิบพบว่าความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยแป้งดิบเพิ่มขึ้นมากกว่าเดิม 2 เท่าของผลรวมความสามารถในการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์แต่ละชนิด

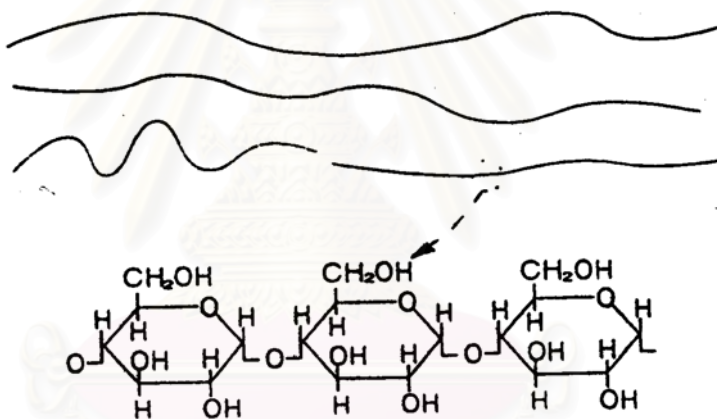
##### 2.1.1 วัตถุประสงค์

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งซึ่งเป็นอาหารที่ให้พลังงานได้จากธรรมชาติโดยการสังเคราะห์แสงของพืช มีสูตรโมเลกุล  $(C_6H_{10}O_5)_n$  แป้งที่ได้จากพืชต่างชนิดกันจะมีลักษณะของเม็ดแป้งต่างกัน ซึ่งตรวจดูได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเฉพาะของเม็ดแป้งนี้ใช้เป็นตัวบ่งชี้

ชนิดของแป้งได้ โดยทั่วไปมักพบแป้งในราก ลำต้น และเมล็ดของพืช แป้งเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคสต่อกันเป็นสายโซ่ยาว โดยปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน (condensation polymerization) ปฏิกิริยาการรวมตัวกันของกลูโคส 2 โมเลกุลจะสูญเสียน้ำ 1 โมเลกุล (Dziedzic and Kearsley, 1984) ในโมเลกุลของแป้งประกอบด้วยโครงสร้างที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ อะไมโลสและอะไมโลเพกติน

### อะไมโลส (Amylose)

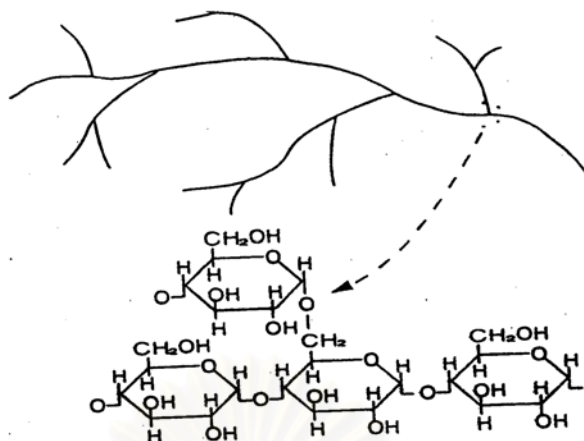
อะไมโลสประกอบด้วย D-glucose ประมาณ 100 - 1,000 หน่วย ยึดต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha(1-4)$  glycosidic linkage เป็นสายโซ่ยาว (linear chain) ไม่มีกิ่งก้าน โดยทั่วไปแป้งมันสำปะหลังประกอบด้วยอะไมโลสประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ อะไมโลสเป็นส่วนที่ละลายน้ำได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารไอโอดีนจะให้สีน้ำเงินเข้ม (intense blue) โครงสร้างของอะไมโลสแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างของอะไมโลส (Dziedzic and Kearsley, 1984)

### อะไมโลเพกติน (Amylopectin)

อะไมโลเพกตินประกอบด้วย D-glucose ต่อกันเป็นสายโซ่ยาวด้วยพันธะ  $\alpha(1-4)$  glycosidic linkage และ D-glucose ที่มีแขนงแยกออกทุก ๆ 20 - 30 หน่วย ตรงจุดแยกของกลูโคสจะต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha(1-6)$  glycosidic linkage อะไมโลเพกตินเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ โดยทั่วไปแป้งมันสำปะหลังประกอบด้วย อะไมโลเพกตินประมาณ 82 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยอย่างน้อยที่สุดประมาณ 1,000,000 และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนจะให้สีม่วงแดง (violet red) โครงสร้างของอะไมโลเพกตินแสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 โครงสร้างของอะไมโลเพกติน (Dziedzic and Kearsley, 1984)

เนื่องจากแป้งประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพกติน ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ดังนั้นคุณสมบัติของแป้งจึงขึ้นอยู่กับอัตราส่วนเชิงโมลของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน

### แป้งมันสำปะหลัง

แป้งมันสำปะหลังผลิตจากหัวมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) มีการผลิตและการใช้ในประเทศไทยในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังส่งออกไปขายในตลาดต่างประเทศด้วย แป้งมันสำปะหลังมีคุณสมบัติโดยรวมและองค์ประกอบทางเคมีเมื่อเปรียบเทียบกับแป้งชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ นอกจากนี้แป้งมันสำปะหลังมีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับแป้งอื่น ๆ เช่นแป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวสาลี ฯลฯ (กล้าณรงค์ ศรีรอด, บรรณานิการ, 2544) คือ

1. สามารถผลิตได้ทั้งปี เนื่องจากมันสำปะหลังสามารถเก็บเกี่ยวได้ตั้งแต่ 8 เดือนขึ้นไป หากสามารถจัดการกับวัชตฤติบได้อย่างถูกต้องจะทำให้มีการจำหน่ายให้กับผู้บริโภคได้ตลอดปี
2. ราคาสามารถแข่งขันกับแป้งชนิดอื่น ๆ ได้
3. เป็นผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากดัดแปลงทางพันธุกรรม (Genetic Modified Organisms, GMOs) กล่าวคือ เป็นที่ยอมรับว่ามันสำปะหลังของไทยไม่เคยมีการปรับปรุงด้านพันธุกรรมตัดต่อซึ่งทำให้เป็นที่ต้องการของหลายประเทศ
4. ปราศจากสีและกลิ่น ซึ่งเป็นจุดเด่นในการใช้ประกอบอาหารเพราะทำให้อาหารไม่เสียคุณลักษณะไปเพราะแป้งที่ใช้ อีกทั้งยังสามารถทำให้การใช้สีหรือกลิ่นในอาหารดีขึ้นอีกด้วย
5. มีความบริสุทธิ์สูง เพราะโดยธรรมชาติแล้วหัวมันสำปะหลังจะไม่สะสมสารอื่น ๆ เช่นฟอสฟอรัส หรือเกลือแร่ต่าง ๆ ในปริมาณมาก ทำให้แป้งมันสำปะหลังมีความบริสุทธิ์สูงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเคมี เช่นการผลิตแป้งดัดแปร หรือทำปฏิกิริยากับสารเคมีต่างๆ ได้ดี (กล้าณรงค์ ศรีรอด, บรรณานิการ, 2544)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติโดยรวมของแป้งมันสำปะหลัง

| คุณสมบัติ   | ปริมาณ    |
|---|-----------|
| องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)  |           |
| - โปรตีน  | 0.15-0.3  |
| - ไขมัน   | 0-0.01    |
| - เถ้า  | 0.10-0.15 |
| ขนาดเม็ดแป้ง (หน่วยไมโครเมตร โดย image analysis)  | 3-34      |
| ความขาว (Kett)  | 81-96     |
| ความโปร่งแสงของเจลแป้ง (ใช้แป้ง 1%)   | 40-50     |
| ร้อยละปริมาณอะมิโลส (โดย HPSEC <sup>1</sup> )   | 17-23     |
| ขนาดอะมิโลส (DPn, โดย HPSEC <sup>1</sup> )  | 2000-4600 |
| กำลังการพองตัวที่ 85°C (แป้ง 0.1g ในน้ำกลั่น 15 ml)   | 40-62     |
| ร้อยละการละลายที่ 85°C (แป้ง 0.1g ในน้ำกลั่น 15 ml)   | 22-42     |
| สมบัติทางความหนืด (RAV <sup>2</sup> , ใช้แป้ง 3 g [ที่ความชื้นแป้ง 14 %] ในน้ำกลั่น 25 g)       |           |
| - อุณหภูมิเริ่มเกิดความหนืด (°C)  | 67-74     |
| - ค่าความหนืดสูงสุด (RVU)   | 350-490   |
| - ค่าความหนืดสุดท้าย (RVU)  | 180-290   |
| สมบัติทางความร้อน (โดย DSC <sup>3</sup> , ใช้แป้ง 30 %)   |           |
| - Onset temperature (°C)  | 60-65     |
| - Peak temperature (°C)   | 67-74     |
| - Conclusion temperature (°C)   | 79-87     |
| - Enthalpy (J/g)  | 14-17     |
| ร้อยละการคืนตัว (DSC, โดยเก็บเจลแป้งที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 7 วัน)                             | 28        |
| ร้อยละการย่อยสลายโดยเอนไซม์<br>(1% ของ $\alpha$ -amylase and glucoamylase ที่ 37°C, 48 ชั่วโมง) | 25-60     |

<sup>1</sup> High Performance Size Exclusion Chromatography

<sup>2</sup> Rapid Visco Analyzer

<sup>3</sup> Differential Scanning Calorimeter

ที่มา: กล้าณรงค์ ศรีรอด, บรรณาธิการ (2544)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งชนิดต่าง ๆ

| ชนิดแป้ง          | สัดส่วนอะมิโลส:<br>อะมิโลเพกติน | ความชื้น<br>(%) | ไขมัน<br>(%) | โปรตีน<br>(%) | เถ้า<br>(%) | ฟอสฟอรัส<br>(%) |
|-------------------|---------------------------------|-----------------|--------------|---------------|-------------|-----------------|
| แป้งข้าวโพด       | 28:72                           | 13              | 0.6          | 0.35          | 0.1         | 0.015           |
| แป้งมันฝรั่ง      | 21:79                           | 19              | 0.05         | 0.06          | 0.4         | 0.08            |
| แป้งสาลี          | 28:72                           | 14              | 0.8          | 0.4           | 0.15        | 0.06            |
| แป้งมันสำปะหลัง   | 17:83                           | 13              | 0.1          | 0.1           | 0.2         | 0.01            |
| แป้งข้าวโพดเหนียว | 0:100                           | 13              | 0.2          | 0.25          | 0.07        | 0.007           |

ที่มา: กล้าณรงค์ ศรีรอด, บรรณาธิการ (2545)

### 2.1.2 เอนไซม์อะไมเลส

ปัจจุบันเอนไซม์ถูกนำมาใช้แทนการย่อยแป้งด้วยกรด เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยามีความจำเพาะต่อชนิดของผลิตภัณฑ์ ควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง หรือการมีสีคล้ำ หรือมีรสขมในผลิตภัณฑ์ รวมทั้งไม่ต้องการอุปกรณ์ที่มีความทนทานการกัดกร่อนสูงเช่นเดียวกับการใช้กรด (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535) โดยทั่วไปการย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสจะใช้กับแป้งที่ทำให้สุกก่อน เนื่องจากแป้งดิบมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (non-dispersible) และต้านทานต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ แป้งที่อยู่ในรูปแกรนูล (granule) หรือแป้งดิบจะไม่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ต้องให้ความร้อนแก่แป้งให้อยู่ในรูปสารละลายจะทำให้เกิดเจลลาคีโนเซชัน

(gelatinization) มีความหนืดเพิ่มขึ้นเนื่องจากแกรนูลของแป้งขยายตัวดูดซึมน้ำเข้าไปทำให้สูญเสียลักษณะ birefringence การย่อยสลายด้วยเอนไซม์จึงเกิดได้เร็วขึ้น (กล้าณรงค์ ศรีรอด และคณะ, 2540)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ได้แก่ พวกเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเป็น extracellular enzyme พบทั้งในสัตว์ เซลล์พืช และจากการสร้างของจุลินทรีย์ (Adam, 1953; Underkofler, 1954)

เอนไซม์อะไมเลสสามารถแบ่งตามตำแหน่งการย่อยแป้งได้ 2 ประเภท (กล้าณรงค์ ศรีรอด และคณะ, 2540) คือ

#### (1) Endoamylase

ย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง  $\alpha(1-4)$  ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวิซซ์และเดกตริน เอนไซม์ประเภทนี้คือ แอลฟาอะไมเลส หรือ amylo (1-4) dextrinase มีชื่อทางเคมีว่า 1,4- $\alpha$ -D-glucon gluconohydrolase (EC 3.2.1.1)

## (2) Exoamylase

ย่อยแป้งจากปลาย non-reduce เข้าไป เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ เบต้าอะไมเลสและ กลูโคอะไมเลส

- เบต้าอะไมเลส หรือ amylo (1-4) maltosidase หรือ 1,4- $\alpha$ -D-glucan maltohydrolase (EC 3.2.1.2) จะย่อยแป้งที่ตำแหน่ง  $\alpha$ (1-4) glycosidic linkage เข้าไปที่ละ 2 หน่วย ของกลูโคสแต่ไม่สามารถย่อยสลายพันธะที่ต่อแบบ  $\alpha$ -D(1-6) ได้ ดังนั้นผลที่ได้้นอกจาก น้ำตาลมอลโตสแล้วจะมีพวกลิมิตเดกตรินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงปนอยู่ด้วย เอนไซม์ชนิดนี้พบมาก ในพืชชั้นสูง เช่นธัญพืชและมันเทศ
- กลูโคอะไมเลส หรือ แกมมาอะไมเลส หรือ amylo (1-4,1-6) glucosidase หรือ 1,4- $\alpha$ -D-glucan glucohydrolase (EC 3.2.1.3) สามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์จากปลาย non - reduce ที่ตำแหน่ง  $\alpha$ (1-4) ,  $\alpha$ (1-3) และ  $\alpha$ (1-6) เข้าไปที่ละหน่วย ถ้าผลการย่อยสมบูรณ์ จะได้กลูโคสเพียงอย่างเดียว

### 2.1.3 การย่อยแป้ง

สำหรับการย่อยแป้งโดยทั่วไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

#### 1. การเตรียมน้ำแป้ง

เป็นขั้นตอนที่ทำให้แป้งสุกหรือเกิดเจลลาติในเซชันโดยการต้มแป้งในน้ำ ซึ่งแป้งจะเกิดการดูดซึมน้ำในระหว่างการให้ความร้อนทำให้เม็ดแป้งมีปริมาตรเพิ่มขึ้น 25-30 เท่า และหากมีการให้ความร้อนสูงขึ้นจะทำให้อะไมโลสแพร่ออกจากเม็ดแป้งทำให้เม็ดแป้งยุบตัวส่งผลให้แป้งละลายน้ำได้ดีขึ้นเกิดเป็นเจลที่ผันกลับไม่ได้และทำให้น้ำแป้งมีความหนืดเพิ่มขึ้น ในการเตรียมน้ำแป้งนี้ นอกจากจะทำให้เม็ดแป้งแตกตัวแล้วยังทำให้โปรตีนและไขมันในแป้งถูกทำลายซึ่งจะเป็นผลดีต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย สำหรับช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเกิดเจลลาติในเซชันขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง โดยแป้งมันสำปะหลังมีช่วงอุณหภูมิในการเกิดเจลลาติในเซชันเท่ากับ 60-70 องศาเซลเซียส (สุดจิตต์ พรหมจิตติพงศ์ และเอี่ยมอนงค์ เรืองชัยชนะวงษ์, 2537)

#### 2. กระบวนการลิเคอแฟคชัน (Liquefaction)

กระบวนการลิเคอแฟคชันเป็นขั้นตอนที่ทำให้แป้งที่ผ่านการเจลลาติในเซชันแล้วมีความหนืดลดลง โดยการย่อยโมเลกุลแป้งแบบสุ่มด้วยกรดหรือเอนไซม์ประเภท endoenzyme ในทางปฏิบัติควรย่อยแป้งให้ได้สมมูลเดกซ์โตรส (Dextrose Equivalent, DE) เท่ากับ 10-15 เพื่อป้องกันการรวมตัวกันของแป้งที่มีโมเลกุลใหญ่ (retrogradation) ซึ่งจะทำให้เกิดตะกอนแขวนลอยยากแก่การแยกออก (กล้าณรงค์ ศรีรอด, 2538)



### 3. กระบวนการแซคคาไรฟิเคชัน (Saccharification)

กระบวนการแซคคาไรฟิเคชันเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการย่อยแป้งขั้นสุดท้ายซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกลูโคส ในขั้นตอนนี้โดยมากมักใช้เอนไซม์ในการย่อยร่วมกับใช้เวลาในการย่อยนานประมาณ 8-72 ชั่วโมง ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

#### 2.1.4 สมมูลเดกซ์โตรส (DE)

คำว่า DE ย่อมาจาก Dextrose Equivalent หมายถึง ร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในตัวอย่าง เมื่อใช้วิธีตรวจวัดด้วยวิธีรีดักชัน (reduction) ในอุตสาหกรรมน้ำเชื่อมกลูโคสนิยมใช้วิธีรีดักชันเป็นตัวตรวจวัดความสามารถในการย่อย เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสมีความสามารถในการทำปฏิกิริยารีดักชันได้ที่คาร์บอนตัวที่ 1 ซึ่งเป็นหมู่แอลดีไฮด์ ในทางเคมีเรียกน้ำตาลพวกนี้ว่า น้ำตาลรีดิวซ์ (กลัคนรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2543)

##### 2.1.4.1 ข้อกำหนดของ DE

DE ถึงแม้ว่าจะหมายความว่า Dextrose Equivalent แต่ก็เพียง equivalent เท่านั้น เช่น น้ำเชื่อมที่วัดค่า DE ได้ 50 อาจจะไม่มีย่านตาลเดกซ์โตรส (หรือกลูโคส) อยู่ในน้ำเชื่อมเลย และน้ำเชื่อมที่มี DE เท่ากันไม่สามารถกล่าวได้ว่าจะมีลักษณะทางฟิสิกส์และเคมีเหมือนกัน เพียงแต่มีกิจกรรมของการรีดักชันอยู่เท่ากันเท่านั้น คุณสมบัติทางฟิสิกส์ เช่น ความหนืด ไม่จำเป็นต้องเท่ากันขึ้นอยู่กับลักษณะทางเคมีว่าส่วนที่ถูกย่อยนั้นเป็นผลิตภัณฑ์ใด ส่วนแบ่งปกติที่มีหน่วยของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันอยู่เป็นสายยาว กล่าวคือ 200 - 2,000 หน่วย สำหรับอะมิโลส หรือ 10,000 หน่วยขึ้นไปสำหรับอะมิโลเพกทิน จึงจะมีหน่วยหรือโมเลกุลที่แสดงกิจกรรมได้ 1 หน่วย ดังนั้นเมื่อนำแบ่งขนาด 100 หน่วยของกลูโคสมาวิเคราะห์หาค่า DE จึงอาจกล่าวได้ว่า DE มีค่าเป็นศูนย์ ทั้งนี้ หมายความว่าโอกาสที่จะหาหน่วยที่มีกิจกรรมรีดักชันพบมีน้อยมาก ถ้านำแบ่งมาย่อยโดยเอนไซม์ที่ดีที่สุด ปรับปัจจัยต่าง ๆ ให้ดีที่สุด แบ่งถูกย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสได้หมด เราจะตรวจวัด DE ได้ 100 ในทางปฏิบัติถือว่าได้สูงกว่า 96 ก็เพียงพอ (กลัคนรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2543) และถ้านำแบ่งมาย่อยโดยเอนไซม์ที่ดีที่สุด ปรับปัจจัยต่าง ๆ ให้ดีที่สุดเช่นกัน แต่เอนไซม์นั้นเป็นเอนไซม์ประเภทที่ย่อยแป้งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น  $\beta$ -amylase จะตรวจวัดค่า DE ได้สูงสุดใกล้เคียง 50 (กลัคนรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2543)

#### 2.1.4.2 การตรวจวัดค่า DE

สำหรับการตรวจวัดค่า DE สามารถอ้างอิงถึงมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำเชื่อม กลูโคส มอก.268-2521 ได้ โดยนำตัวอย่างน้ำเชื่อมกลูโคสมาตรวจวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดก่อน เพราะตัวอย่างเป็นของเหลว จากนั้นนำตัวอย่างไปตรวจหาจำนวนหน่วยที่มีกิจกรรมรีดักชันแล้ว คำนวณน้ำหนักโดยใช้น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสได้น้ำหนักเท่าไรจึงมาเทียบเป็นร้อยละกับ น้ำหนักแห้ง (ซึ่งก็คือปริมาณของแข็งทั้งหมดของตัวอย่าง) จะได้คำตอบคือค่า DE แต่ในการปฏิบัติ หรือการควบคุมคุณภาพระหว่างการผลิตนั้นอาจใช้รีแฟรกโตมิเตอร์ (refractometer) เป็นตัววัดหา ร้อยละของของแข็งทั้งหมดได้ (กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2543)

$$DE = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้} * 100}{\text{น้ำหนัก (ของแข็ง) ของตัวอย่าง}}$$

#### 2.2 กัม (Gum)

ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยได้มีการพัฒนาเจริญก้าวหน้ามากขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่นำออกจำหน่ายมีความหลากหลายทั้งชนิดและรูปแบบ เป็นผลให้มีการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรตลอดจนวัตถุดิบสังเคราะห์ประเภทสารแขวนลอย (colloidal agent) สารคงสภาพ (stabilizer) สารพองตัว (swelling agent) สารเพิ่มความข้นหนืด (thickening agent) สารเคลือบ (coating agent) และอื่น ๆ เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย วัตถุดิบสังเคราะห์เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นสาร โพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีด้วยกันหลายชนิดรวมเรียกว่า กัม (gum) ซึ่งสามารถ แบ่งกัมได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่กัมที่ได้จากธรรมชาติและกัมที่ได้จากการสังเคราะห์ นอกจากนี้จะ ใช้กัมในอุตสาหกรรมอาหารแล้วยังมีการใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ อีกหลายประเภท สำหรับประเทศไทยพบว่ายังไม่มีการผลิตแทนแทนกัมเชิงการค้าเพื่อใช้ประโยชน์ภายในประเทศยังคงต้องนำเข้า ผลิตภัณฑ์ของแทนแทนกัมในรูปแบบต่าง ๆ ปีละหลายสิบล้านบาทเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร (ตามลิกา ยุวอมรพิทักษ์ และ ราไพ เกณฑ์สาคร, 2537) ดังตารางที่ 3 นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสังเคราะห์แทนแทนกัมเข้ามาใช้ในรูปของผลิตภัณฑ์ช่วยในการขุดเจาะน้ำมัน เนื่องจากเป็นสารที่มีความหนืดสูงและเป็นสารบริสุทธิ์ที่สามารถแยกออกจากน้ำมันได้ง่ายหลังจากผ่านการกลั่นให้บริสุทธิ์อีกด้วย

ตารางที่ 3 มูลค่าการนำเข้ากัมชนิดต่าง ๆ

| ปี พ.ศ. | กัมชนิดต่าง ๆ* (ล้านบาท) | สารเปกติน** (ล้านบาท) |
|---------|--------------------------|-----------------------|
| 2531    | 31,606,250               | 2,696,049             |
| 2532    | 74,736,075               | 7,393,325             |
| 2333    | 48,720,375               | 10,121,285            |
| 2534    | 44,376,652               | 14,838,964            |
| 2535    | 36,637,103               | 24,211,980            |
| 2536    | 46,702,045               | 42,811,816            |
| 2537    | 53,106,606               | 74,260,616            |

ที่มา : กรมศุลกากร อ้างถึงใน ฑาติศา ยุวอมรพิทักษ์ และ รำไพ เกณฑ์สาธุ (2537)

\* กัมที่นำเข้าได้แก่ shellac, stick lac, other lac, gum arabic, gum damar, gumbier, gumboge, balsams, kubuak powder, gum tragachanth, natural resins unmodified, other natural gum and gumresins

\*\* สารเปกตินได้แก่ pectic substance, pectinates และ pectates

สารโพลีแซคคาไรด์ซึ่งแบ่งประเภทไว้ข้างต้นนั้นมาจากสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิด ทั้งพืชชั้นต่ำ และพืชชั้นสูง สัตว์ และจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 กัมจากสาหร่าย พืช และจุลินทรีย์

| Algal                                      | Botanical   | Microbial   |
|--|---|---|
| Agar , Algin ,Carrageenan ,<br>Furcellaran | Guar gum , Gum arabic ,<br>Gum ghatti , Gum tragacanth<br>,Karaya gum , Locust bean<br>gum,Pectin | Dextran , Xanthan gum ,<br>Gallan gum, Curdlan , Pullulan |

ที่มา : Baird และ Pettitt (1991)

สำหรับโพลีแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์มีด้วยกันหลายชนิดซึ่งสร้างขึ้นภายในเซลล์และขับออกสู่ภายนอกเซลล์จึงเรียกว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (exopolysaccharide) ซึ่งมีชื่อแตกต่างกันตามโครงสร้างและชนิดของจุลินทรีย์ exopolysaccharide บางชนิดได้มีการผลิตเชิงการค้าบ้าง

แล้วแต่บางชนิดยังอยู่ในระหว่างการทดลอง ตารางที่ 5 แสดงถึงปริมาณการใช้และราคาของกัมชนิดต่าง ๆ ที่มีการใช้เฉลี่ยเป็นรายปี

ตารางที่ 5 ปริมาณการใช้และราคาของกัมชนิดต่าง ๆ

| ชนิดของกัม         | ปริมาณการใช้ในแต่ละปี (ตัน) |               | ราคา<br>(US \$/kg ) |
|--------------------|-----------------------------|---------------|---------------------|
|                    | สหรัฐอเมริกา                | ทั่วโลก       |                     |
| Alginate           | -                           | 23000         | 5-15                |
| Curdlan            | -                           | -             | 940                 |
| Dextran            | 2000                        | -             | 35-390              |
| Dextran derivative | 600                         | -             | 400-2,800           |
| Gellan             | *                           | -             | 66-75               |
| Hyaluronic acid    | 500                         | -             | 2,000-100,000       |
| Pullulan           | -                           | -             | 11.5                |
| Rhamsan gum        | *                           | -             | 25                  |
| Welan gum          | *                           | -             | 25                  |
| Xanthan gum        | 20000                       | -             | 10 - 14             |
| Gum arabic         | -                           | 25000 - 40000 | 2.8                 |
| Gum guar           | -                           | 10000 - 15000 | 0.9                 |
| Gum tragacanth     | -                           | -             | 25                  |

ที่มา: Sutherland (1990)

\* ยังไม่ผลิตเชิงการค้า

### 2.3 แซนแทนกัม (Xanthan Gum)

สารพวก exopolysaccharide จากจุลินทรีย์ที่สำคัญที่นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวางได้แก่แซนแทนกัม (xanthan gum) ซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *Xanthomonas campestris* แซนแทนกัมเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอางและอุตสาหกรรมอื่น ๆ เนื่องจากแซนแทนมีลักษณะทาง rheology ที่โดดเด่นคือมีความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นของสารละลายเกลือ สามารถให้ความหนืดที่ค่อนข้างสูงแม้จะใช้ในปริมาณน้อย จึงนิยมใช้ในทางอุตสาหกรรมมากมายทั้งในเรื่องคุณสมบัติของการละลายที่ดี การเป็น pseudoplastic รวมทั้งคุณสมบัติในการกระจายตัวที่ดี จึงถูกใช้เป็น suspending, stabilizing, thickening และ

emulsifying agent เป็นต้น (Moreno et al., 1998) มีการประมาณการว่าทั่วโลกผลิตแซนแทนกัมประมาณ 20,000 ตันต่อปี (Swings and Civerolo, 1993) แซนแทนกัมเป็น secondary metabolite polysaccharide ที่ผลิตได้จากกระบวนการ biotechnological fermentation โดยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *X. campestris* ในสภาวะที่มีการให้อากาศในระหว่างการหมัก ถูกค้นพบเมื่อ 50 ปีที่แล้วในรัฐ Illinois (USA) มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิต extra-cellular polysaccharides ได้ แต่อย่างไรก็ตามมีเพียงแซนแทนเท่านั้นที่เป็น microbial polysaccharide ที่มีการผลิตกันอย่างกว้างขวางในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้แซนแทนถูกใช้ในการเพิ่มปริมาตรและความหนืดให้กับขนมปังและผลิตภัณฑ์ขนมอบอื่น ๆ เพื่อเป็นสารทดแทนกลูเตนสำหรับในผู้บริโภคกลุ่มที่มีอาการแพ้กลูเตนได้อีกด้วย และแซนแทนกัมยังเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งเมื่อรับประทานเข้าไปในรูปที่เป็นส่วนประกอบของอาหารจะมีการย่อยในลำไส้เล็กน้อยจึงเป็นการเพิ่มปริมาณกากในลำไส้ซึ่งเป็นผลดีต่อระบบขับถ่าย (ศศิธร โชติศศิธร, 2535) ในปี 1971 สำนักงานอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (United States Food and Drug Administration, USFDA) ได้ออกประกาศอนุญาตให้ใช้แซนแทนเติมลงในอาหารและยาได้ (Betz, 1979 อ้างถึงใน ศศิธร โชติศศิธร, 2535) ดังตารางที่ 6

#### ตารางที่ 6 การใช้แซนแทนกัมทางด้านอาหาร

| หน้าที่                                   | ผลิตภัณฑ์อาหาร              |
|---|-----------------------------|
| เป็นกาว (adhesive)                        | น้ำตาลเคลือบขนมและเคลือบงา  |
| สารเชื่อม (binding agent)                 | อาหารสัตว์                  |
| สารเคลือบ (coating)                       | ลูกกวาด                     |
| สารอิมัลชัน (emulsifying agent)           | น้ำสลัด                     |
| สารเคลือบหุ้ม (encapsulation)             | ผงกลิ่นรส                   |
| สร้างฟิล์ม (film formation)               | เคลือบป้องกัน เปลือกไส้กรอก |
| สารทำให้ฟองคงสภาพ (foam stabilizer)       | เบียร์                      |
| ตกตะกอนเบา (colloid precipitation)        | ไวน์และเบียร์               |
| สารให้ความคงตัว (stabilizer)              | ไอศกรีม น้ำสลัด             |
| สารพองตัว (swelling agent)                | ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์         |
| สารยับยั้งการแยกตัว (syneresis inhibitor) | เนยแข็ง อาหารแช่แข็ง        |
| สารให้ความข้นหนืด (thickening agent)      | แยม ซอส น้ำเชื่อม           |

ที่มา : Sutherland (1993)

## 2.4 จุลินทรีย์สร้างแซนแทนกัม

เชื้อ *X. campestris* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ใน Family Pseudomonadaceae ที่ก่อโรคใบจุด ใบไหม้ และโรคที่อระบบลำเลียงในพืช ค้นพบครั้งแรกโดยสถาบัน NRRL (Northern Religion Research Laboratory) (Pettitt, 1978) แบคทีเรียชนิดนี้ต้องการอากาศในการเจริญ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน (rod) มีขนาดกว้าง 0.2 – 0.8 ไมครอน ยาว 0.6-2.0 ไมครอน เซลล์ส่วนใหญ่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ บาง อยู่เป็นคู่หรือเกาะเป็นโซ่ มีแฟลกเจลลา (flagella) ซึ่งมีจำนวน 1 เส้นหรือมากกว่าที่ปลายข้างหนึ่งของเซลล์เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ เซลล์ย้อมติดสีแกรมลบ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งจะให้โคโลนีมีสีเหลืองกลมมนขอบเกลี้ยง (Jacob and Genstein, 1960) และมีลักษณะเป็นเมือกซึ่งเกิดจากการสะสมแซนแทนกัมรอบ ๆ ผนังเซลล์ ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *X. campestris*

ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระบบบัฟเฟอร์มีสภาพอ่อนเชื้อจะสร้างกรดปริมาณเล็กน้อยจากคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด ยกเว้น rhamnose inulin adonitol dulcitol inositol หรือ salicin และน้อยมากจาก sorbital สามารถไฮโดรไลซ์แป้งและ tween 80 ได้เร็วมาก ไม่สามารถรีดิวซ์ในเตรทเป็นไนโตรท มีการสร้าง  $H_2S$  จากซีสเตอีนและส่วนใหญ่สร้างจากไทโอซัลเฟตและเปปโตน ไม่สร้างแอสเตอิตินและสามารถใช้แอสปาราจีนเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน การเจริญของเชื้อสามารถยับยั้งได้เมื่อมีการเติม triphenyl tetrazolium chloride 0.1 เปอร์เซ็นต์ แต่โดยทั่วไป 0.02 เปอร์เซ็นต์ ก็สามารถยับยั้งได้ (อรนุช เฝ้าจินดา, 2540) ขนาดโคโลนีของเชื้อมีความสัมพันธ์ต่อความสามารถในการผลิตแซนแทนกัมโดยโคโลนีขนาดใหญ่จะให้ประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมสูงกว่าโคโลนีที่มีขนาดเล็ก (Remir et al., 1988 cited in Rodriguez and Aguilar , 1997) จากงานวิจัยของ ศศิธร โชติศศิธร (2535) ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* ที่มีโคโลนี

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-5 มิลลิเมตร และโคโลนีขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร พบว่าแซนแทนกัมที่ผลิตจากเชื้อที่มีโคโลนีขนาดใหญ่ให้ความหนืดสูงกว่าเชื้อที่มีโคโลนีขนาดเล็ก 2 เท่าและเมื่อเลี้ยง *X. campestris* ในอาหารที่มีการเขย่าหรือกวนเพื่อให้อากาศ แรงเฉือนจากการให้อากาศนี้จะทำให้แซนแทนกัมที่สะสมอยู่รอบ ๆ เซลล์หลุดลงสู่น้ำหมักทำให้น้ำหมักมีความหนืดเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4 และ 5 การดำรงชีวิตเป็นแบบต้องการสารอาหารจากภายนอก (chemoorganotrophic) คุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการสร้างกัมคือ 28 องศาเซลเซียส สภาพความเป็นที่กรด-ด่างอยู่ในช่วง 6-7.5

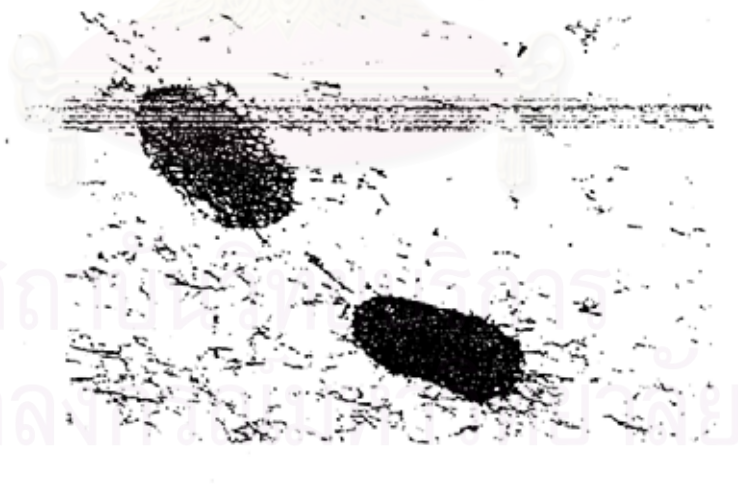
ปัจจุบันมีรายงานว่าแซนแทนกัมสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดในสกุล *Xanthomonas spp.* นอกจาก *X. campestris* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ให้แซนแทนกัมที่มีคุณภาพมาตรฐานและนิยมใช้ในเชิงพาณิชย์ทั่วไป เช่น *X. begoniae*, *X. malvacearum*, *X. carotae*, *X. incanae*, *X. phascoli*, *X. vesicatoria*, *X. apavericola*, *X. translucens*, *X. vasculorum* และ *X. hedrae* (Lee, 1981 อ้างถึงใน ศศิธร ไซตติศศิธร, 2535)

## 2.5 โครงสร้างแซนแทนกัม

แซนแทนกัมเป็นสารจำพวก extracellular anionic heteropolysaccharide (Rajeshwari, Prakash and Ghosh, 1995) ผลิตได้จากเชื้อ *X. campestris* โครงสร้างของแซนแทนกัมประกอบไปด้วยหน่วยย่อยที่มีโครงสร้างซ้ำกัน (repeating unit) ซึ่งประกอบไปด้วย D-glucose, D-mannose และ D-glucuronic acid ในอัตราส่วน 2:2:1 (Jansson, Kenne and Lindberg, 1975) โดยมี  $\beta$ -(1,4)-D-glucose เป็นสายโซ่หลักและมี trisaccharide เป็น side chain ซึ่งประกอบด้วย mannose- $\beta$ (1,4)-glucuronic acid- $\beta$ (1,2)-mannose โดย side chain ต่อกับ glucose ซึ่งเป็นสายโซ่หลักด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,3-linkages (Harding, Cleary and Ielpi, 1995) mannosyl residues ตัวที่ติดกับ side chain มี acetyl group เกาะอยู่ในขณะที่ตัวนอก mannosyl residues มี pyruvyl group เชื่อมกับ cyclicketals ดังรูปที่ 6 องค์ประกอบของ organic acid ใน แซนแทน ได้รับผลกระทบจากแหล่งของคาร์บอน ออกซิเจนและไนโตรเจนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบต่าง ๆ โดยเฉพาะจำนวน acetylation ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติของสารละลายแซนแทน (Moreno et al., 1998) ปริมาณกลุ่ม O-acetyl และ pyruvate ketal จะมีมากขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียและสภาวะแวดล้อมของการเจริญเติบโต (ฉมาลีศา ยุวอมรพิทักษ์ และ ราไพ เกณฑ์สาคร, 2537) มีรายงานว่าความแตกต่างของปริมาณกลุ่มไพรูวิลเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดความแปรผันของคุณภาพแซนแทน Sanford และคณะ (1977) ได้ศึกษาถึงสารละลายแซนแทนที่มีความแตกต่างของปริมาณกรดไพรูวิลพบว่า



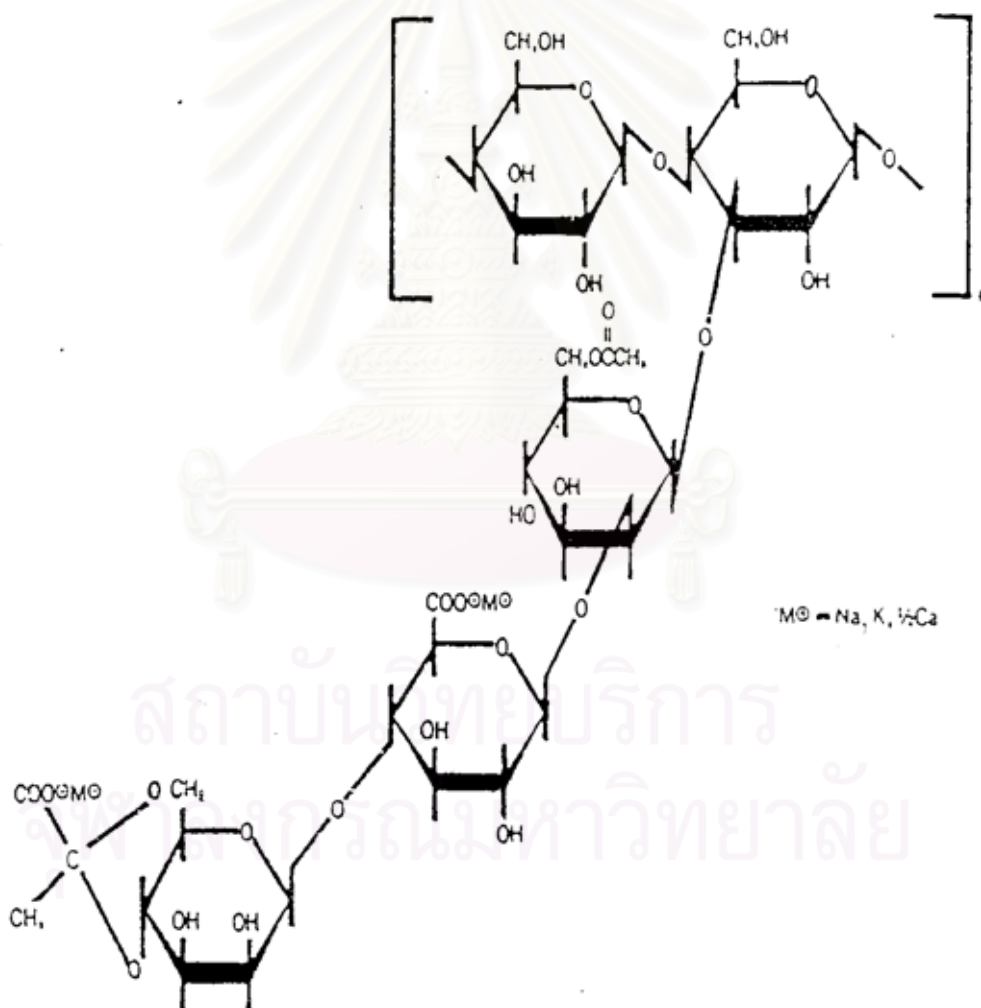
รูปที่ 4 ภาพถ่าย electron micrograph ของการสะสมแซนแทนกันรอบเซลล์ *X. campestris* เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง (Hen et al., 1989 cited in ถันยาภรณ์ นาวินวรณ, 2542)



รูปที่ 5 ภาพถ่าย electron micrograph ของแซนแทนกันซึ่งหลุดออกจากเซลล์ *X. campestris* ลงสู่น้ำหมักเมื่อมีการกวนให้อากาศ 400 รอบต่อนาที (Hen et al., 1989 cited in ถันยาภรณ์ นาวินวรณ, 2542)



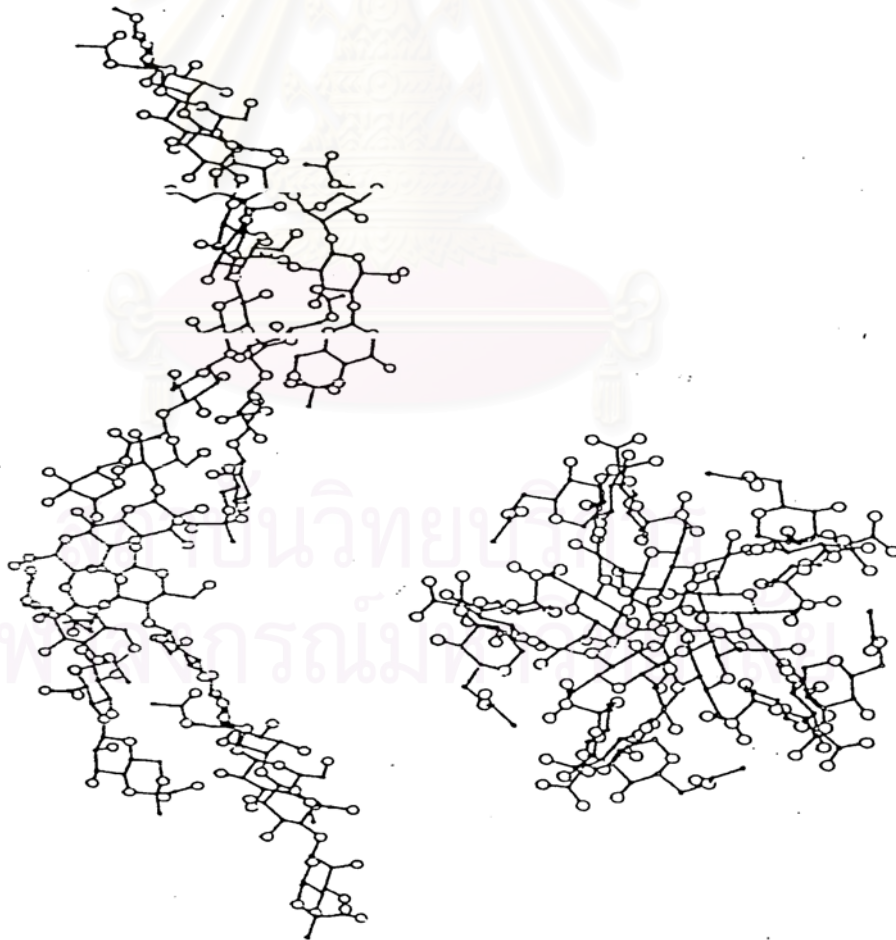
ความหนืดของสารละลายแซนแทนจะแปรผันตามปริมาณกลุ่มไพรวูลที่มีในโมเลกุลของแซนแทนด้วย ถ้าแซนแทนกัมมีหมู่อะซิติกและโดยเฉพาะหมู่ไพรวูลจำนวนมากจะส่งผลให้สารละลายมีความหนืดสูงเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลที่ดี ส่วนแซนแทนที่ปราศจากหมู่ไพรวูลจะเหมาะสำหรับใช้ในงานการขุดเจาะน้ำมัน (Casas, Santos and Garcia-Ochoa, 2000) นอกจากนี้ความแตกต่างของปริมาณกลุ่มไพรวูลที่แทนที่บนโมเลกุลของแซนแทนกัม จะมีผลให้ได้กัมที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป ซึ่งปริมาณกรดไพรวูลสามารถใช้เป็นตัวชี้บ่งบอกถึงคุณภาพของแซนแทนกัมได้ (Cadmus et al., 1978) โดยทั่วไปแซนแทนกัมจะมีปริมาณกรดไพรวูลโดยเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 4 - 5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณกลุ่มอะซิติกมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก คืออยู่ในช่วง 4 - 4.5 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 6 โครงสร้างของแซนแทนกัม (Baird and Pettitt, 1991)

แซนแทนกัมมีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ประมาณ  $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$  และมีคุณสมบัติเป็นสารจำพวกโพลีอิเล็กโทรไลต์ (polyelectrolyte) ที่ละลายน้ำได้ดี โดยมากในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของเกลือของสารประกอบต่าง ๆ ผสมกัน เช่น โปแตสเซียม โซเดียม แคลเซียม ฯลฯ โดยโลหะเหล่านี้จะเข้าทำปฏิกิริยาที่กลุ่มคาร์บอกซิล (carboxyl group) พบว่า โปแตสเซียมจะมีการทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุด เนื่องจากกลุ่มคาร์บอกซิลของแซนแทนกัมมีน้อย ดังนั้นจะไม่เกิดปฏิกิริยาไขว้ข้าม (cross-linking) กับ divalent cation เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม (Rocks, 1971)

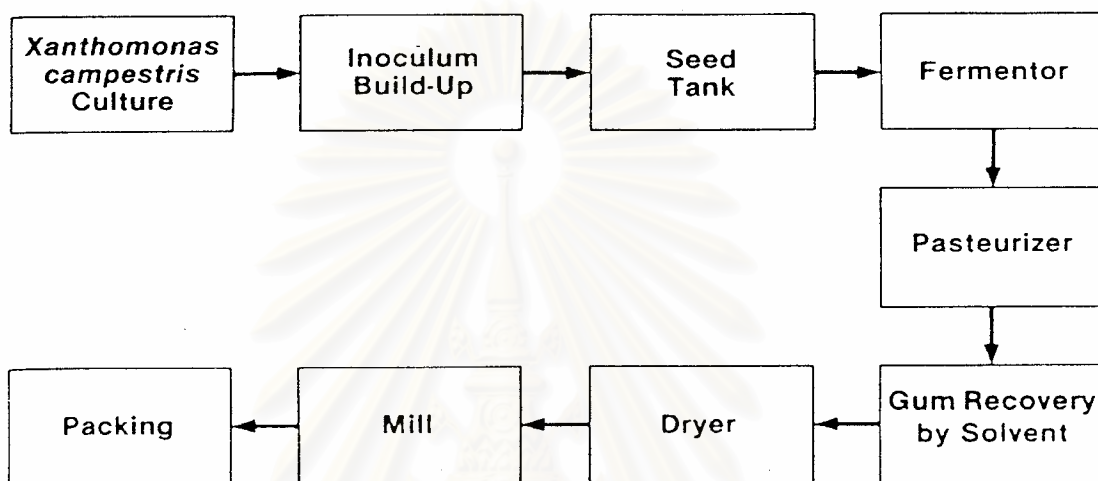
ได้มีการศึกษาการจัดโครงสร้างของแซนแทนกัมโดยใช้หลักการกระเจิงของรังสี X-ray ในเส้นใยแซนแทนกัม พบว่ามีการจัดวางตัวเป็นบันไดวนเกลียวเดี่ยว มีเส้นผ่านศูนย์กลางการหมุนเท่ากับ 4.7 นาโนเมตรดังรูปที่ 7 ในการจัดโครงสร้างแบบนี้เป็นไปได้ว่าโมเลกุลคงสภาพได้โดยพันธะไฮโดรเจน (Moorhouse, Walinshaw and Arnott, 1977) และแม้กระทั่งอยู่ในรูปของสารละลายแซนแทนกัมจะยังคงสภาพเป็นเกลียวเช่นเดิม



รูปที่ 7 การจัดเรียงตัวของโครงสร้างแซนแทนกัม (Moorhouse et al., 1977)

## 2.6 การผลิตแซนแทนกัม

กระบวนการผลิตแซนแทนกัมในอุตสาหกรรมคือ หลังจากที่ทำกรเพิ่มจำนวนเชื้อตั้งต้นของ *X. campestris* ที่ทำการคัดเลือกสายพันธุ์มาอย่างดีแล้ว จึงนำไปทำการหมักและเมื่อได้น้ำหมักมาแล้วนำไปให้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ให้เหลืออยู่น้อยที่สุด นำไปตกตะกอนแซนแทนกัมแล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงแยกก่อนนำไปอบแห้ง บด แล้วร่อนเพื่อคัดขนาดก่อนบรรจุจำหน่ายแล้วแสดงดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 กระบวนการผลิตแซนแทนกัม (Baird and Pettitt, 1991)

นอกจากนี้วิธีการหมักแบบต่าง ๆ ก็มีผลต่อการผลิตแซนแทนกัม โดย Lo, Yang และ Min (1997) รายงานว่าการหมักโดยวิธี two-stage fermentation ออกแบบมาเพื่อให้เซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็วและให้ได้ yield ในการผลิตแซนแทนที่สูง ในทางตรงกันข้ามวิธี fed-batch fermentation ที่มีการใส่กลูโคสลงไปเป็นระยะ ๆ ไม่ได้ช่วยในการผลิตแซนแทนเพราะอัตราส่วนระหว่างกลูโคสต่อ yeast extract ที่ต่ำทำให้ได้ xanthan production rate และ yield ต่ำ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ yeast extract ในปริมาณสูงมีความสำคัญมากเพื่อให้เซลล์เจริญสูงสุดก่อนถึง stationary phase เพราะความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงมีความสำคัญต่อการผลิตแซนแทนในอัตราที่สูงด้วย Amanullah, Satti และ Nienow (1998) ทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวโดยใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตรและมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ไม่ให้ต่ำกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว พบว่าได้ปริมาณแซนแทนเมื่อสิ้นสุดการหมักเท่ากับ 33.1 กรัมต่อลิตร ส่วนการหมักแบบป้อนเป็นช่วงที่ใช้น้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร และเติมลงไปอีก 10 กรัมต่อลิตรเมื่อเชื้อเจริญถึงจุดสิ้นสุดของช่วง log phase ทำการเลี้ยงในสภาวะเดียวกันพบว่าให้ แซนแทนเมื่อสิ้นสุดการหมักเท่ากับ 33.8 กรัมต่อลิตร

## 2.7 สมบัติทางกายภาพของแซนแทนกัม

สมบัติทางกายภาพ (physical properties) เป็นคุณสมบัติที่แตกต่างกันของสารพอลิแซคคาไรด์แต่ละชนิด ในการเลือกจะใช้จะต้องพิจารณาคุณสมบัติทางกายภาพประกอบด้วยซึ่ง Davidson (1980) ได้เสนอสมบัติทางกายภาพของแซนแทนกัมที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (food grade) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 สมบัติทางกายภาพของแซนแทนกัมที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

| สมบัติ                                     | ค่าที่ยอมรับได้ |
|--|-----------------|
| สถานะ                                      | แห้งเป็นผง      |
| ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)                     | 11              |
| เถ้า (เปอร์เซ็นต์)                         | 9               |
| สี   | 70              |
| ความถ่วงจำเพาะ                             | 1.5             |
| ความหนาแน่น (กิโลกรัม / ลูกบาศก์เมตร)      | 836             |
| อุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนสี (องศาเซลเซียส) | 165             |
| อุณหภูมิที่เกิดการไหม้ (องศาเซลเซียส)      | 240             |
| อุณหภูมิที่เกิดเถ้า (องศาเซลเซียส)         | 470             |
| สารละลายแซนแทนกัม 1 เปอร์เซ็นต์            |                 |
| ความร้อนของสารละลาย (แคลอรี / กรัม)        | 0.080           |
| ค่าดัชนีการสะท้อนกลับที่ 20 องศาเซลเซียส   | 1.3338          |
| ค่าความเป็นกรด – ด่าง                      | 7               |
| แรงตึงผิว (ดาเยน / เซนติเมตร)              | 75              |
| จุดเยือกแข็ง (องศาเซลเซียส)                | 0               |
| ความหนืดเมื่อมีอิเล็กโตรไลต์ 1 เปอร์เซ็นต์ | 1,400           |
| ขนาดอนุภาค (Tyler standard)                | 80,200          |

ที่มา: Davidson (1980)

## 2.8 คุณสมบัติโดยทั่วไปของแซนแทนกัม

### 2.8.1 ความสามารถในการละลาย

แซนแทนกัมสามารถละลายได้อย่างรวดเร็วทั้งในน้ำร้อนหรือน้ำเย็นและให้ความหนืดที่สูงแม้จะใช้กัมในปริมาณต่ำ ซึ่ง Rocks (1971) ได้รายงานว่แซนแทนกัมที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จะให้ความหนืดประมาณ 800-1,000 เซนติพอยซ์ (Brookfield Viscosimeter model LVT ที่ความเร็ว 60 รอบต่อนาที) และยังสามารถละลายได้ดีในกรด ต่างและสารละลายเกลือหลายชนิด รวมทั้งมีความสามารถในการละลายร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เอทานอล ไอโซโพรพานอลและอะซิโตนที่มีความเข้มข้นสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ได้โดยการเติมตัวทำละลายอย่างช้า ๆ และคนอย่างสม่ำเสมอแต่จะตกตะกอนทันทีถ้าใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่านี้ (Rocks, 1971)

### 2.8.2 คุณสมบัติทางการไหล

สารละลายแซนแทนกัมเป็นของไหลประเภท Non-Newtonian fluid ที่มีสมบัติเป็น pseudoplastic สูง คือ ถ้ามีแรงกระทำต่อสารละลายกัมน้อย ๆ (shear rate ต่ำ) สารละลายกัมจะมีความต้านทานสูง แต่เมื่อเพิ่มแรงกระทำขึ้น (shear rate สูง) ความหนืดก็จะลดลงอย่างรวดเร็วทำให้ไหลได้ง่ายขึ้น (Betz, 1979) ระดับความเป็น pseudoplastic ของแซนแทนกัมจะสูงขึ้นด้วยการเพิ่มความเข้มข้น ซึ่งคุณสมบัตินี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีความเข้มข้นสูงขึ้น คุณสมบัติเช่นนี้จะช่วยป้องกันการตกตะกอนของสารขนาดใหญ่ ป้องกันหยดน้ำมันไม่ให้ลอยขึ้นบนผิวหน้า และช่วยในการปั๊มทำให้สะดวกในการบรรจุ (Anonymous, 1974)

### 2.8.3 ความคงตัวของความหนืด

#### 2.8.3.1 ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

เมื่อเปรียบเทียบความหนืดของสารละลายแซนแทนกัมกับความหนืดของสารละลายกัมทั่วไปพบว่าสารละลายแซนแทนกัมสามารถคงความหนืดให้คงที่แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงกว้าง อุณหภูมิมีผลน้อยมากต่อความหนืดของสารละลายแซนแทนกัมที่มีความเข้มข้นสูง โดย Betz (1979) ได้ทดลองเพิ่มอุณหภูมิในช่วง 0-95 องศาเซลเซียสให้แก่สารละลายแซนแทน 1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความหนืด 1,000 เซนติพอยซ์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าความหนืดเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 100 เซนติพอยซ์ เมื่อเติมลงในอาหารทำให้มีความคงตัวสูงไม่เกิดการแยกชั้นขณะแปรรูปหรือเก็บรักษาเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ส่วนสารละลายกัมทั่วไปเมื่อให้ความร้อนในเวลาสั้น ๆ ความหนืดจะ

ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นและเมื่อสารละลายนี้มีอุณหภูมิลดลงจนเท่าอุณหภูมิห้องแล้วจะมีความหนืดเท่ากับเมื่อเริ่มต้น (Kovacs, 1973) การมีเกล็ดเล็กน้อยช่วยให้แซนแทนมีความต้านทานการแตกตัวด้วยดีทนความร้อนได้สูงขึ้น จากคุณสมบัตินี้เมื่อเติมแซนแทนกัมลงในอาหารจะทำให้อาหารมีความคงตัวสูงและไม่เกิดการแยกชั้น ไม่ถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyte) แม้อุณหภูมิในขณะที่เก็บหรือขณะที่แปรรูปอาหารจะเปลี่ยนแปลง

### 2.8.3.2 ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง

สารละลายกัมหลายชนิดจะมีความหนืดเปลี่ยนแปลงไปตามค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่เปลี่ยนไปแต่ในสารละลายแซนแทนกัมจะเกิดการเปลี่ยนแปลงความหนืดน้อยมากเมื่อความเป็นกรดหรือด่างเปลี่ยนแปลง แซนแทนกัมสามารถใช้เป็นสารให้ความหนืดในสารละลายที่มีกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และในสารละลายที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์สูงถึง 5 เปอร์เซ็นต์ ได้โดยไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความหนืดแต่อย่างใด (Rocks, 1971) ตามลิสซา ยูออมรพิทักษ์ และ จำไพ เกณฑ์สาคร (2537) กล่าวว่าสารละลายแซนแทนกัมที่มีสภาพกรดและด่างต่าง ๆ กันสามารถคงสภาพความหนืดได้ดีแม้เวลาจะผ่านไป ดังแสดงในตารางที่ 8

### 2.8.3.3 ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกล็ด

แซนแทนกัมเป็นสารเพิ่มความข้นหนืดชนิดเดียวที่เมื่อเติมเกล็ดโมโนวาเลนซ์ลงไปแล้วไม่มีผลต่อสารละลาย ซึ่งในทางตรงกันข้ามสารละลายของสารให้ความข้นหนืดชนิดอื่น ๆ จะสูญเสียความหนืดไปมากหลังจากเติมเกล็ดลงไป ปริมาณน้อยเกล็ดมีส่วนช่วยให้สารละลายแซนแทนกัมมีความคงตัวเมื่อได้รับความร้อน สารละลายที่มีแซนแทนกัมมากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ การเติมเกล็ดลงไปเพียงเล็กน้อยจะช่วยให้เพิ่มความหนืดได้ แต่ถ้าสารละลายที่มีแซนแทนความเข้มข้นต่ำการเติมเกล็ดลงไปเล็กน้อยอาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความหนืด สารละลายแซนแทนกัมสามารถละลายได้ดีในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 25 เปอร์เซ็นต์ (Rocks, 1971) ส่วนภาวิณี โลหะนะ (2524) ได้อ้างถึง General Mill Chemical, Inc., (n.d.) ที่พบว่ามีการละลายบางอย่างที่แซนแทนกัมละลายได้ไม่ดีได้แก่ สารละลายซึ่งมี polyvalent metal ion บางชนิด สารเหล่านี้จะทำให้แซนแทนกัมตกตะกอนลงมาหรืออาจเกิดลักษณะเจลขึ้นในสารละลายแซนแทนกัมที่มีความเข้มข้นต่ำการเพิ่มความเข้มข้นของเกล็ดเพียงเล็กน้อยมีผลต่อการ

เปลี่ยนแปลงความหนืดและ Betz (1979) สรุปว่าความหนืดของสารละลายแซนแทนกัมขึ้นกับปริมาณกัมและปริมาณเกลือ

**ตารางที่ 8** ความคงตัวของความหนืดของสารละลายแซนแทนกัมในกรด-ต่างและเกลือชนิดต่าง ๆ (เซนต์ปีทอยส์)

| สารละลาย                             | 1 วัน | 7 วัน | 14 วัน | 24 วัน | 42 วัน |
|--------------------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|
| H <sub>2</sub> O                     | 3200  | 3200  | 3150   | 3100   | 3100   |
| 26 % NaCl                            | 6950  | 7630  | 8720   | 8600   | 8500   |
| 8 % NaCl , 2.5 % CaCl                | 4500  | 4400  | 4700   | 4700   | 4560   |
| 10% KCl                              | 4050  | 3650  | 4000   | 4000   | 3800   |
| 1 % NaOH                             | 3900  | 3900  | 3930   | 4060   | 4000   |
| 10 % NaOH                            | 6200  | 5350  | 5700   | 5300   | 4550   |
| 10 % NH <sub>4</sub> OH              | 3430  | 3340  | 3400   | 3350   | 3320   |
| 10 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 12000 | 14600 | 14800  | 16800  | 16000  |
| 10 % KOH                             | 3820  | 3860  | 4000   | 4040   | 4000   |
| 30 % KOH                             | 5660  | 4200  | 3670   | 3540   | 2300   |
| 40 % KOH                             | 4300  | 3330  | 2770   | 2440   | 1630   |
| 60 % Acetic acid                     | 4980  | 5120  | 5560   | 5630   | 5600   |
| 40 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>  | 5400  | 5480  | 5520   | 6000   | 6000   |
| 15 % HCL                             | 3400  | 2880  | 2680   | 1670   | 800    |

ที่มา: ตมาลิตา ยวอมรพิทักษ์ และ รำไพ เกณฑ์สาธุ (2537)

## 2.9 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแซนแทนกัม

### 2.9.1 แหล่งอาหาร

#### 2.9.1.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญต่อการผลิตแซนแทนกัมมากกว่าการเจริญของเชื้อ (Moraine and Rogovin, 1966) ในปี 1958 Lilly, Wilson และ Leach ได้รายงานว่ายานว่า *Xanthomonas* spp. สามารถเจริญและผลิตโพลีแซคคาไรด์ได้เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนหลายชนิด

เช่น กลูโคส ซูโครส soluble starch แป้งข้าวโพด และ casein hydrolysate แต่ที่นิยมใช้ส่วนใหญ่คือกลูโคสที่ความเข้มข้น 2 – 4 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือซูโครสแต่มักให้ประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนต่ำกว่า McNeely (1966) รายงานว่าการผลิตแซนแทนกัมจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หรือไม่ขึ้นทราบดีโดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักถ้าพบว่าเหลือน้อยกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงว่าได้เกิดการผลิตแซนแทนกัมอย่างสมบูรณ์แล้ว

Funahashi และคณะ (1987) ได้ศึกษาผลกระทบความเข้มข้นของกลูโคสต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตแซนแทนกัมพบว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นมากกว่า 50 กรัมต่อลิตรจะไปจำกัดการเจริญของเซลล์และทำให้การผลิตแซนแทนลดลง การรักษาความเข้มข้นของกลูโคสในช่วง 30–40 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบป้อนเป็นช่วงโดยหลีกเลี่ยงความเข้มข้นที่สูงในช่วงแรกจะทำให้ความเข้มข้นของแซนแทนกัมสูงถึง 43 กรัมต่อลิตรเมื่อเปรียบเทียบกับ 30 กรัมต่อลิตรในการทดลองหมักแบบขั้นตอนเดียว ในปี 1961 Rogovin, Anderson และ Cadmus เลี้ยงเชื้อ *X. campestris* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าน้ำตาลกลูโคสเพียง 50 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นแซนแทนกัมและให้ผลผลิตกัมสูงสุดเพียง 1.6 เปอร์เซ็นต์ การใช้น้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงกว่านี้จะไม่เพิ่มปริมาณกัมขึ้น Wernau และ William (1979) พบว่าการใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสเริ่มต้นมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะมีผลไปยับยั้งการเจริญของเชื้อและทำให้กระบวนการหมักหยุดชะงักก่อนเวลาอันสมควร Amanullah, Satti และ Nienow (1998) พบว่าความเข้มข้นของแซนแทนสูง ๆ นั้นสามารถเกิดขึ้นได้ถ้ามีการควบคุมอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งในขั้นตอนที่เชื้อมีการเจริญเพิ่มจำนวนและในขั้นตอนที่มีการผลิตแซนแทนและได้ทำการทดลองใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 54 กรัมต่อลิตร ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Funahashi และคณะ (1987) ที่กล่าวถึงการหมักที่ไม่มีประสิทธิภาพเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นมากกว่า 50 กรัมต่อลิตร ส่วน Zhao และคณะ (1991) รายงานว่าการหมักแบบขั้นตอนเดียวที่ใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส 24 กรัมต่อลิตรจะให้แซนแทนที่มีความเข้มข้น 18 กรัมต่อลิตร และ Rajeshwari และคณะ (1995) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแซนแทนคือ 50 กรัมต่อลิตร Moraine และ Rogovin (1966) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเชื้อ *X. campestris* ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณกัม 1.4 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน แต่อาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ เชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้เกือบหมด ส่วนในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ การใช้กลูโคสจะหยุดชะงักเมื่อค่าความเป็นกรด-ต่างลดลงมาถึง 5.5 และตรวจพบกลูโคสในอาหารเหลืออยู่มากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์



### 2.9.1.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญโดยตรงต่อการเจริญของเชื้อ (Moraine and Rogovin, 1966) ซึ่งกระตุ้นให้เชื้อมีการเจริญสูงส่งผลให้อัตราการผลิตแซนแทนกัมเพิ่มมากขึ้นด้วย โดย specific rate ของการผลิตแซนแทนกัมจะขึ้นกับความเข้มข้นมากกว่าชนิดของไนโตรเจนที่ใช้ (Pinches and Pallent, 1986) McNeely (1968) รายงานว่าการใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลทำให้กัมที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น การใช้แอมโมเนียมไนเตรทที่มีความเข้มข้นมากเกินไปจะไปยับยั้งการเจริญและการผลิตกัมและถ้าใช้ในปริมาณที่น้อยเกินไปจะทำให้ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

Godet (1973) กล่าวว่าไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ถ้าไนโตรเจนมากเกินไปจะไปลดประสิทธิภาพในการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็น polysaccharide (Whistler and Bemiller, 1973) ซึ่งสอดคล้องกับ Souw และ Demain (1979) ไนโตรเจนจะมีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรียแต่ไม่ค่อยมีความสำคัญในช่วงการผลิตแซนแทน ดังนั้นอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ ๆ จะเป็นที่ต้องการในช่วงแรกที่เชื้อมีการเจริญเติบโตเพื่อให้เกิดความเข้มข้นของเซลล์ที่สูง ๆ (Amanullah, Satti and Nienow, 1998)

การควบคุมอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมทั้งในระยะที่เชื้อมีการเจริญเติบโตและระยะที่มีการผลิตแซนแทนทำให้ได้แซนแทนที่มีความเข้มข้นสูงเพราะไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์มากกว่าในขั้นตอนการผลิตแซนแทน โดยอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ต่ำจะเป็นที่ต้องการในช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตเพื่อให้เกิดการสร้างปริมาณเซลล์ที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ทำให้ specific growth rate สูงด้วยซึ่งอาจส่งผลให้ xanthan productivity rate สูงตามด้วยเช่นกัน ในทางตรงกันข้ามระยะที่มีการสังเคราะห์แซนแทนจะต้องการอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่สูง ๆ (Amanullah, Satti and Nienow, 1998) De Vuyst, Van Loo และ Vandamme (1987) ทำการหมักแบบ 2 ขั้นตอนโดยให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำในช่วงแรกของ cell propagation และให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงในระยะที่มีการผลิตทำให้ได้แซนแทนกัมที่มีความเข้มข้นสูงถึง 30 กรัมต่อลิตร และยังกล่าวอีกว่าระหว่างการหมักแบบขั้นตอนเดียวของ *X. campestris* นั้นมี 2 ระยะ โดยระยะแรกคือ trophophase เป็นระยะที่เซลล์เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนซึ่งมีความสัมพันธ์กับความต้องการปริมาณออกซิเจนที่สูงและในอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ต่ำและระยะที่ 2 คือ idiophase เป็นระยะที่เริ่มมีการผลิตแซนแทนกัมความต้องการออกซิเจนจะลดลงแต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง Davidson (1978) รายงานว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนจำกัดจะให้ปริมาณกรดไพรูวิกที่เป็นหมู่แทนที่สูงและปริมาณอะซิเตทน้อย

### 2.9.1.3 แหล่งเกลือแร่

แหล่งเกลือแร่จะทำหน้าที่เป็น cofactor และเป็นองค์ประกอบของ coenzyme ในเมแทบอลิซึมของเชื้อ (Roseiro et al., 1992) เกลือแร่เป็นเป็นสารอาหารที่เชื้อต้องการในปริมาณน้อยแต่ก็ขาดไม่ได้ ถ้าปริมาณเกลือแร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เหมาะสมอาจยับยั้งการสร้างแซนแทนกันัมได้ แร่ธาตุที่จุลินทรีย์มีความต้องการเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างโพลีแซคคาไรด์ ได้แก่ โปแตสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แมงกานีส แคลเซียม โมลิบดีนัม เหล็ก ทองแดง และสังกะสี ซึ่งถ้ามีการให้มากหรือน้อยเกินไปจะมีผลในการไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Whistler and Bermiller, 1973) Souw และ Demain (1979) ได้รายงานถึงอิทธิพลของฟอสเฟตที่มีต่อการเจริญและการผลิตแซนแทนกันว่าปริมาณที่เหมาะสมของโปแตสเซียมฟอสเฟตที่มากเกินไปจะมีผลทำให้มีการผลิตแซนแทนลดลง แต่จะไม่มีผลต่อการเจริญ Godet (1973) ได้เสนอว่าแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการสร้างโพลีแซคคาไรด์สำหรับฟอสเฟตควรรักษา โซเดียม โปแตสเซียม หรือแอมโมเนียมฟอสเฟต

### 2.9.2 ความเป็นกรด – ด่าง (pH)

ภาวิณี โลหะนะ (2524) อ้างถึง Pettitt (1978) ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยที่ต้องติดตามและควบคุมตลอดระยะเวลาของการหมักให้เกิดความเหมาะสมในระหว่างการผลิตหาค่าความเป็นกรด -ด่าง ของน้ำหมักลดต่ำกว่าจุดวิกฤตคือประมาณ 5.0 จะทำให้เชื้อสร้างแซนแทนกันัมได้น้อยลง ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมควรอยู่ที่ 6.0 - 7.5 การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นเกิดจากการที่จุลินทรีย์ได้มีการผลิตกรดอินทรีย์ขึ้นในขณะที่ทำกรหมัก (Pettitt, 1978) Moraine และ Rogovin (1971) สรุปผลการทดลองไว้ว่าเมื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมสามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อและเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างแซนแทนกันัมได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังได้รายงานว่า โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นด่างที่เหมาะสมในการใช้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างมากกว่าแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ส่วน Cadmus และคณะ (1978) รายงานว่าการปรับค่าความเป็น กรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ให้ต่ำกว่า 6.8 จะมีผลให้การเจริญของจุลินทรีย์ดีขึ้น สามารถใช้น้ำตาลได้หมด และมีการสร้างกันัมได้มากขึ้น

### 2.9.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการสร้างโพลีแซคคาไรด์ของจุลินทรีย์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะเป็นอุณหภูมิที่จุลินทรีย์สร้างโพลีแซคคาไรด์ได้เพิ่มขึ้น (Whistler and Bemiller, 1973) Harding และคณะ (1995) เสนอว่า

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแซนแทนกันคือ 30–33 องศาเซลเซียส ต่างกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อซึ่งเท่ากับ 24-27 องศาเซลเซียส Lilly และคณะ (1958) พบว่า *Xanthomonas phaseoli* สามารถสร้างโพลีแซคคาไรด์ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 - 35 องศาเซลเซียส ผลผลิตสูงสุดอยู่ในช่วง 33 องศาเซลเซียส และไม่สร้างสารดังกล่าวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

#### 2.9.4 ปริมาณอากาศ

เมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นทำให้น้ำหมักมีความหนืดสูงขึ้นเนื่องจากจุลินทรีย์มีการสร้างโพลีแซคคาไรด์มากขึ้น ซึ่งจะไปขัดขวางการแพร่กระจายของอากาศเข้าสู่เซลล์ทำให้การสร้างแซนแทนกันลดลงสามารถเพิ่มอากาศให้แก่เชื้อได้โดยเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่าและเพิ่มอัตราส่วนของใบพัดหรือเพิ่มอากาศเข้าสู่ระบบ Salam, Fadel และ Murad (1994) รายงานว่าที่อัตราส่วนของอากาศต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3:2 จะให้ประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกันมากที่สุดเนื่องจากกระบวนการผลิตแซนแทนกันจำเป็นต้องมีออกซิเจนที่เพียงพอเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic conditions) การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนให้อากาศของใบพัดสามารถช่วยให้ออกซิเจนละลายได้มากขึ้นเมื่อน้ำหมักมีความหนืดสูงขึ้นและยังช่วยในเรื่องของการถ่ายเทมวลของก๊าซและของเหลวในน้ำหมักอีกด้วย เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกวนให้อากาศที่อัตราสูงขึ้นเรื่อย ๆ นอกจากจะพบว่ามี การถ่ายเทมวลของออกซิเจนสูงขึ้นแล้วปริมาณเซลล์ที่บาดเจ็บก็เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Casas et al., 2000) Asim และ Ghosh (1999) ได้ทำการทดลองแบบ batch fermentation พบว่าเมื่อ specific xanthan productivity ลดลงเพราะมีการจำกัดการถ่ายเทออกซิเจนด้วยความหนืดของน้ำหมักสามารถแก้ไขได้โดยเพิ่มความเร็วในการกวนจาก 600 รอบต่อนาที เป็น 1,000 รอบต่อนาที แม้ว่าการเจริญของเซลล์จะไม่แตกต่างกันแต่ yield ของแซนแทนเพิ่มขึ้นเนื่องจากออกซิเจนที่เพิ่มขึ้น

Peter และคณะ (1989) รายงานถึงผลการทดลองศึกษาอิทธิพลของอัตราเร็วในการกวนของใบพาย (Agitation rate) ต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตแซนแทนกันในถังหมักขนาด 15 ลิตร ที่มีการให้อากาศ 0.33 ปริมาตรต่อลิตรต่อนาที โดยทำการแปรความเร็วของการกวนของใบพัดตั้งแต่ 200 ถึง 800 รอบต่อนาที พบว่าอัตราเร็วในการกวนที่ 200 รอบต่อนาทีทำให้การเจริญของเซลล์ต่ำสุดและให้ผลผลิตลดลงเกือบ 3 เท่า ส่วนที่ความเร็วการกวน 400 รอบต่อนาที จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกัมพอ ๆ กับการกวนที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที แสดงว่าการผลิตแซนแทนกันสูงขึ้นเมื่อใช้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศสูงขึ้นซึ่งชี้ให้เห็นว่าอัตราการสร้างแซนแทนกันขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจน Cadmus และคณะ (1978) ศึกษาอัตราการให้อากาศในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่าอากาศมีผลต่อการผลิตโพลีแซคคาไรด์ เมื่อปรับอัตราการให้อากาศเป็น 0.75 ปริมาตรต่อลิตรต่อนาทีจะให้กัมที่มีปริมาณกรดไพรูวิกสูงสุด การให้อากาศให้อากาศ

สูงขึ้นจะลดเวลาของการหมักที่ให้ผลผลิตแซนแทนกัมสูงสุดได้เร็วขึ้น Peter และคณะ (1989) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของแซนแทนจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณออกซิเจนไม่ถูกจำกัดซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Flores, Torres และ Galindo (1994) ในปี ค.ศ. 2000 Casas และคณะรายงานว่า การเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตแซนแทนกัมจะมีค่าสูงสุดเมื่อให้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศที่ 500 รอบต่อนาที และที่ 800 รอบต่อนาทีทั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตแซนแทนค่อนข้างต่ำทั้งนี้อาจเนื่องจากเซลล์เกิดการเสียหายเพราะแรงจากการกวน ส่วนที่อัตราเร็วในการกวนให้อากาศที่ 100 รอบต่อนาที ให้ทั้งปริมาณเซลล์และแซนแทนที่ต่ำเพราะออกซิเจนถูกจำกัด สภาวะที่มีออกซิเจนเพียงพอและแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมมีผลต่อ mass transfer, nutrient feed และ homogenization ทำให้มีการขับแซนแทนออกนอกเซลล์อย่างต่อเนื่องจนกระทั่งเกิดการยับยั้งโดยบาง form ของตัวผลิตภัณฑ์เอง (Amanullah, Serrano et al., 1998) De Vuyst และคณะ (1987) กล่าวว่า การ mixing ที่ไม่เพียงพอทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์เพราะเมื่อความหนืดเพิ่มขึ้นจะไปขัดขวางการแพร่กระจายของออกซิเจนทำให้เชื้อไม่สามารถใช้ น้ำตาลเพื่อการผลิตแซนแทนกัมได้อย่างสมบูรณ์

### 2.9.5 อายุและปริมาณหัวเชื้อ

Pinches และ Pallent (1986) และ Harding และคณะ (1995) ได้รายงานว่าแซนแทนกัมเป็นสารทุติยภูมิซึ่งเชื้อ *X. campestris* สร้างขึ้นที่ปลาย log phase จนถึง stationary phase ของการเจริญ ดังนั้นหัวเชื้อที่นำมาใช้ควรเจริญอยู่ในช่วงกลาง log phase จนถึง stationary phase ซึ่งมีอายุประมาณ 24 – 48 ชั่วโมง ส่วนปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมส่วนใหญ่นิยมใช้ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรหัวเชื้อ / ปริมาณการผลิต)

### 2.9.6 การแยกแซนแทนกัมออกจากน้ำหมัก

ทำการแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกจากน้ำหมักก่อนโดยเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1-10 เท่า เพื่อลดความหนืดทำการปั่นเหวี่ยงเอาเซลล์ออกและนำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนแซนแทนกัมด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนิยมใช้เอทานอลมากที่สุด อัตราส่วนที่ใช้คือ 2-3 เท่าต่อปริมาตรของน้ำหมักที่ผ่านการเจือจางและแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกแล้วทำการตกตะกอนร่วมกับเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์หรือเกลือโซเดียมคลอไรด์ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารอิเล็กโทรไลต์ Sanford และคณะ (1977) พบว่า การตกตะกอนแซนแทนโดยเติมเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์และเอทิลแอลกอฮอล์ 2 ส่วนโดยปริมาตรจะมีผลทำให้แซนแทนที่มีไพรวุทสูง (มากกว่า 4 เปอร์เซ็นต์) มีแรงยึดเกาะกันสูง ตกตะกอนได้ดี ส่วนแซนแทนที่มีไพรวุทต่ำ (2.5 เปอร์เซ็นต์) เมื่อตกตะกอนด้วยวิธีนี้จะได้ตะกอนที่มีลักษณะด้อยกว่า

## บทที่ 3

### วิธีการทดลอง

#### 3.1 วัตถุประสงค์

แป้งมันสำปะหลังตราปลามังกร โรงงานแป้งมันไทยท่า จังหวัดชลบุรี

#### 3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

##### 3.2.1 อุปกรณ์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น ASTELL บริษัท ASTELL SCIENTIFIC ประเทศอังกฤษ
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ยี่ห้อ LAB - LINE ประเทศสหรัฐอเมริกา บริษัท Scientific Promotion Co.,Ltd. นำเข้า
- เครื่องเขย่า (rotary shaker) รุ่น G2-033 & G50 series บริษัท NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC ) ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องเขย่าผสม (vortex) รุ่น SUPER - MIXER 1291 บริษัท LAB - LINE INSTRUMENTS ประเทศสหรัฐอเมริกา
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ BIBBY รุ่น SBS 30 บริษัท STUART SCIENTIFIC ประเทศอังกฤษ
- เครื่องไมโครเวฟ ยี่ห้อ Litton "Futura" รุ่น AH 15610.A ประเทศสหรัฐอเมริกา
- มาตรวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH - meter) ยี่ห้อ Schott รุ่น CG 840 ประเทศเยอรมัน
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ SARTORIUS รุ่น BP 2215 ประเทศเยอรมัน บริษัท Scientific Promotion Co.,Ltd. นำเข้า
- เครื่องนับจำนวนโคโลนี (colony counter) รุ่น CWN - 334 บริษัท GALLENKAMP ประเทศเยอรมัน
- เครื่องวัดความหนืด (viscosimeter) ยี่ห้อ Brookfield รุ่น LVDV-I+ CP Version 4.1 บริษัท Brookfield Eng Labs Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องวัดความหนืด (viscosimeter) ยี่ห้อ Brookfield รุ่น LVDV-II+ Version 3.2 บริษัท Brookfield Eng Labs Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

- ถังหมักเชื้อ (fermenter) ยี่ห้อ B.Braun รุ่น BIOSTAT® B บริษัท B.Braun Biotech International ประเทศเยอรมันนี
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น IEC Multi RF บริษัท Thermo IEC ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ HETTICH รุ่น EBA 12 บริษัทเบคไทยกรุงเทพ อุปกรณ์เคมีภัณฑ์ จำกัด นำเข้า
- เครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) ยี่ห้อ BUCHI รุ่น R-200 บริษัท Buchi Labortechnik AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- ตู้อบแห้ง รุ่น WTB binder ประเทศเยอรมันนี บริษัท Scientific Promotion Co.,Ltd. นำเข้า
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Jasco V-530 บริษัทสิทธิพร แอสโซซิเอต จำกัด นำเข้า
- ชุด Gel Permeation Chromatography (Sephacryl® 200 HR) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น BVT 123 บริษัท Dryer Instruments, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

### 3.2.2 สารเคมี

| <u>สารเคมี</u>        | <u>บริษัทผู้ผลิต</u> | <u>ประเทศ</u>  |
|-----------------------|----------------------|----------------|
| - กรดซิติริก          | MERCK                | เยอรมันนี      |
| - กรดซัลฟิวริก        | MERCK                | เยอรมันนี      |
| - กรดบอริก            | MERCK                | เยอรมันนี      |
| - กรดไฮโดรคลอริก      | MERCK                | เยอรมันนี      |
| - กรดอะซิติก          | MERCK                | เยอรมันนี      |
| - กรดไดไนโตรซาลิไซลิก | FLUKA                | สวิตเซอร์แลนด์ |
| - แอมโมเนียมซัลเฟต    | UNIVAR               | ออสเตรเลีย     |
| - เฟอร์ริกคลอไรด์     | MERCK                | เยอรมันนี      |

| <u>สารเคมี</u>                          | <u>บริษัทผู้ผลิต</u> | <u>ประเทศ</u>  |
|---|----------------------|----------------|
| - แคลเซียมคาร์บอเนต                     | FLUKA                | สวีตเซอร์แลนด์ |
| - โพลีเทสซีเอ็มไดไฮโดรเจนฟอสเฟต         | UNIVAR               | ออสเตรเลีย     |
| - ซิงค์ออกไซด์                          | UNIVAR               | ออสเตรเลีย     |
| - รูนิง                                 | DIFCO                | อังกฤษ         |
| - เปปไตน์                               | MERCK                | เยอรมันนี      |
| - กลูโคส                                | Scharlan             | สเปน           |
| - ยีสต์เอ็คแทรกซ์                       | MERCK                | เยอรมันนี      |
| - มอลด์เอ็คแทรกซ์                       | DIFCO                | อังกฤษ         |
| - คอปเปอร์ซัลเฟต                        | UNIVAR               | ออสเตรเลีย     |
| - โซเดียมคลอไรด์                        | LAB SCAN             | ไอร์แลนด์      |
| - โซเดียมไฮดรอกไซด์                     | UNIVAR               | ออสเตรเลีย     |
| - เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (BAN 480L)        | NOVO NORDISH         | เดนมาร์ก       |
| - เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (AMG E)           | NOVO NORDISH         | เดนมาร์ก       |
| - แซนแทนกัม (Satiaxane™ CX 91)          | DEGUSSA              | อังกฤษ         |
| - โซเดียมโพลีเทสซีเอ็มทราเทต            | UNIVAR               | ออสเตรเลีย     |
| - แอนตี้โฟม (Silicon Antifoaming Agent) | MERCK                | เยอรมันนี      |
| - แคลเซียมคลอไรด์                       | MERCK                | เยอรมันนี      |
| - ฟีนอล                                 | MERCK                | เยอรมันนี      |
| - โซเดียมคาร์บอเนต                      | UNIVAR               | ออสเตรเลีย     |
| - โบวีน ซีรัม อัลบูมิน                  | MERCK                | เยอรมันนี      |
| - เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์                | เมธากรู๊ป            | ประเทศไทย      |
| - โซเดียมอะซิเตท                        | Carlo Erba           | อิตาลี         |
| - เดกซ์แทรนมาตรฐาน (standard dextran)   | FLUKA                | สวีตเซอร์แลนด์ |

### 3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Xanthomonas campestris* TISTR 840 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

### 3.4 การเก็บรักษาเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการทดลองทำได้โดยถ่ายเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ลงในหลอดอาหารแข็งลาตเตียสสูตร Yeast Malt Extract (YM) (ภาคผนวก ก 2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น หัวเชื้อตั้งต้นในการทดลองโดยควรทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ 14 วัน

### 3.5 การเตรียมแหล่งคาร์บอนจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

เตรียมแหล่งคาร์บอนโดยการเตรียมแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ดัดแปลงวิธีจากกัลลาณรงค์ ศรีรอด และคณะ, 2540) ในน้ำกลั่นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เติม 1 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 0.5 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำแป้งและเติมแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร กวนให้เข้ากันโดยใช้ใบพัดที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็น จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.1 - 4.3 นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เติม 1 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส 0.5 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำแป้งและกวนให้เข้ากันโดยใช้ใบพัดที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที และทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว ทำการกรองและเก็บตัวอย่างมาวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้สารละลาย 3,5 Dinitrosalicylic acid (DNSA) (Robyt and Whelan, 1965) (ภาคผนวก ข 1) และหาค่า DE ของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ก่อนนำไปเก็บในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -5 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Roseiro สูตรปรับปรุง (ธัญยาภรณ์ นาวินวรณ, 2542) (ภาคผนวก ก 3)



### 3.6 ศึกษาหน้าหนักโมเลกุลของไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วย เอนไซม์โดยใช้วิธี Gel Permeation Chromatography

นำไฮโดรไลเซตจากข้อ 3.5 มาทำการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้วิธี Gel Permeation Chromatography ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด Sephacryl<sup>®</sup> 200 HR และใช้สารละลายไซเดียมอะซิเตท ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.2 เป็นสารละลายตัวพา ซึ่ดไฮโดรไลเซตเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 15 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ไหลผ่านคอลัมน์ออกมาทุก ๆ 2 มิลลิลิตรมาทำการตรวจหาปริมาณ total carbohydrate (Dobois et al., 1956) (ภาคผนวก ข 2) และเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้สารเดกซแทรน มาตรฐานเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข 7)

### 3.7 ศึกษาผลของอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของไบโอฟัดต่อกระบวนการผลิตแซนแทนกัมแบบขั้นตอนเดียวในถังหมัก (Batch Fermentation)

#### 3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อ *X. campestris* TISTR 840

ถ่ายเชื้อ 1 loop จากข้อ 3.4 ลงอาหารเหลวสูตร YM (ภาคผนวก ก 1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเหลวสูตร YM (ภาคผนวก ก 1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรขวดใหม่อีกครั้งหนึ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อโดยใช้อัตราการเขย่า 200 รอบต่อ นาที เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตแซนแทนกัม

#### 3.7.2 แปรอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของไบโอฟัด

ทำการหมักแซนแทนกัมในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อจากข้อ 3.7.1 ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ Roseiro สูตรปรับปรุง (ธัญยาภรณ์ นาวินวรรณ, 2542) (ภาคผนวก ก 3) ปริมาตร 2 ลิตรที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 30:1 โดยใช้ไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน มีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยแปรอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของไบโอฟัดในน้ำหมักเป็น 3 แบบ ดังนี้

#### 3.7.2.1 ใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศของไบโอฟัดที่ 400 รอบต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 72

- 3.7.2.2 ใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดที่ 300 รอบ/นาที ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 24 และที่อัตราเร็ว 500 รอบต่อนาที ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 72
- 3.7.2.3 ใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดที่ 200 รอบต่อนาที ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 24 อัตราเร็ว 600 รอบต่อนาที ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 48 และ อัตราเร็ว 700 รอบต่อนาที ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 72

เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ในแต่ละวิธีโดยทำการตรวจวัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักด้วยวิธี DNSA (ภาคผนวก ข 1) ความหนืดของน้ำหมัก ปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหมัก) และ % crude xanthan (ภาคผนวก ข 6)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 4 ซ้ำและวิเคราะห์ ความแตกต่างโดยวิธี Duncan 's new multiple range test

### 3.8 ศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840

3.8.1 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840

เลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 โดยใช้หัวเชื้อจากข้อ 3.7.1 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ Roseiro สูตรปรับปรุง (ธัญยาภรณ์ นาวินวรรณ, 2542) (ภาคผนวก ก 3) กระตุ้นให้เชื้อมีการเจริญสูงสุดด้วยการแปรอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5:1 10:1 และ 15:1 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เลี้ยงเชื้อโดยใช้อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ติดตามการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมัก โดยวิธี DNSA (ภาคผนวก ข 1) ค่าความหนืดของน้ำหมักและ % cell dry weight เมื่อสิ้นสุดการหมัก

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 4 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan 's new multiple range test

3.8.2 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ

*X. campestris* TISTR 840

นำน้ำหมักที่ได้จากการคัดเลือกอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมในข้อ 3.8.1 มาปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ที่ตกตะกอนลงมาด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งโดยใช้อุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายเซลล์ที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ Roseiro สูตรปรับปรุง (ธัญยาภรณ์ นาวินวรณ, 2542) (ภาคผนวก ก 3) ที่แปรอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 20:1 30:1 และ 40:1 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และทำการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 94 ชั่วโมง

ติดตามการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักด้วยวิธี DNSA (ภาคผนวก ข 1) ความหนืดของน้ำหมักและ % crude xanthan (ภาคผนวก ข 6)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 4 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan ' s new multiple range test

### 3.9 ศึกษากระบวนการผลิตแซนแทนกัมโดยการหมักแบบป้อนเป็นช่วงแบบ 2 ขั้นตอน (Two-Stage Fermentation )

ทำการหมักแซนแทนกัมแบบ 2 ขั้นตอนในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยขั้นตอนแรกใช้หัวเชื้อจากข้อ 3.7.1 ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ Roseiro สูตรปรับปรุง (ธัญยาภรณ์ นาวินวรณ, 2542) (ภาคผนวก ก 3) ปริมาตร 2 ลิตรที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.8.1 โดยใช้ไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้กลูโคส มีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 39 ชั่วโมง และใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดในน้ำหมักที่เหมาะสมตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.7 ขั้นที่ 2 ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของน้ำหมักให้เท่ากับค่าที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.8.2 ปริมาตรรวม 3 ลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปจนครบ 63 ชั่วโมง

เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับวิธีการหมักแบบขั้นตอนเดียว (batch fermentation) โดยทำการตรวจวัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในน้ำหมักด้วยวิธี DNSA (ภาคผนวก ข 1) วัดความหนืดของน้ำหมัก และ % crude xanthan (ภาคผนวก ข 6)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 4 ซ้ำ และวิเคราะห์ ความแตกต่างโดยวิธี Duncan 's new multiple range test

### 3.10 วิเคราะห์คุณสมบัติของแซนแทนกัม

#### 3.10.1 วิเคราะห์ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

ละลายแซนแทนกัมความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ทำการแปรอุณหภูมิของสารละลายแซนแทนกัมเป็น 30 50 70 และ 90 องศาเซลเซียส

#### 3.10.2 วิเคราะห์ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด – ด่าง

ละลายแซนแทนกัมความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการแปรค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายแซนแทนกัมเป็น 2 4 6 8 10 และ 12 วัดความหนืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

#### 3.10.3 วิเคราะห์ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายเกลือ

ละลายแซนแทนกัมความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และทำการแปรความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ วัดความหนืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

#### 3.10.4 วิเคราะห์ความหนืดของสารละลายแซนแทนกัม

ละลายแซนแทนกัมความเข้มข้น 0.0 0.1 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 วัดความหนืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

#### 3.10.5 วิเคราะห์ความเป็น Pseudoplastic ของสารละลายแซนแทนกัม

ละลายแซนแทนกัมความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 วัดความหนืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรค่า shear rate เป็น 1.0 2.0 4.0 5.0 8.0 และ 10.0 ( $\text{sec}^{-1}$ )

ทำการวิเคราะห์ตั้งแต่ข้อ 3.10.1 – 3.10.5 โดยใช้แซนแทนกัมที่ได้จากการทดลองเมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวโดยใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 1 (ข้อ 3.7.2.1) และแบบที่ 2 (ข้อ 3.7.2.2) แซนแทนกัมที่ได้จากการหมักแบบสองขั้นตอนโดยใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 3 (ข้อ 3.7.2.3) และแซนแทนกัมในระดับเกรดอาหาร (Satiaxane™ CX 91) เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติด้านต่าง ๆ

### 3.11 วิเคราะห์องค์ประกอบของแซนแทนกัม

- 3.11.1 หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNSA (Robynt and Whelan, 1965) (ภาคผนวก ข1)
- 3.11.2 หาปริมาณของ total carbohydrate ของแซนแทนกัม วิเคราะห์โดยวิธี phenol-sulphuric reagent (Dobois et al., 1956) (ภาคผนวก ข 2)
- 3.11.3 หาปริมาณ total protein วิเคราะห์โดยวิธี Lowry method (Lowry et al., 1951) (ภาคผนวก ข 3)
- 3.11.4 หาปริมาณ total nitrogen วิเคราะห์โดยวิธี Micro Kjeldahal Analysis (AOAC, 2000) (ภาคผนวก ข 4)
- 3.11.5 หาปริมาณความชื้นของแซนแทนกัม (AOAC, 2000) (ภาคผนวก ข 5)
- 3.11.6 วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของแซนแทนกัม  
หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของแซนแทนกัมโดยใช้วิธี Gel Permeation Chromatography (ภาคผนวก ข 8)

เปรียบเทียบผลการทดลอง ข้อ 3.11.1–3.11.6 โดยใช้แซนแทนกัมที่ได้จากการทดลองเมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวโดยใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 1 (ข้อ 3.7.2.1) และแบบที่ 2 (ข้อ 3.7.2.2) แซนแทนกัมที่ได้จากการหมักแบบสองขั้นตอนโดยใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 3 (ข้อ 3.7.2.3) และแซนแทนกัมในระดับเกรดอาหาร (Satiaxane™ CX 91)

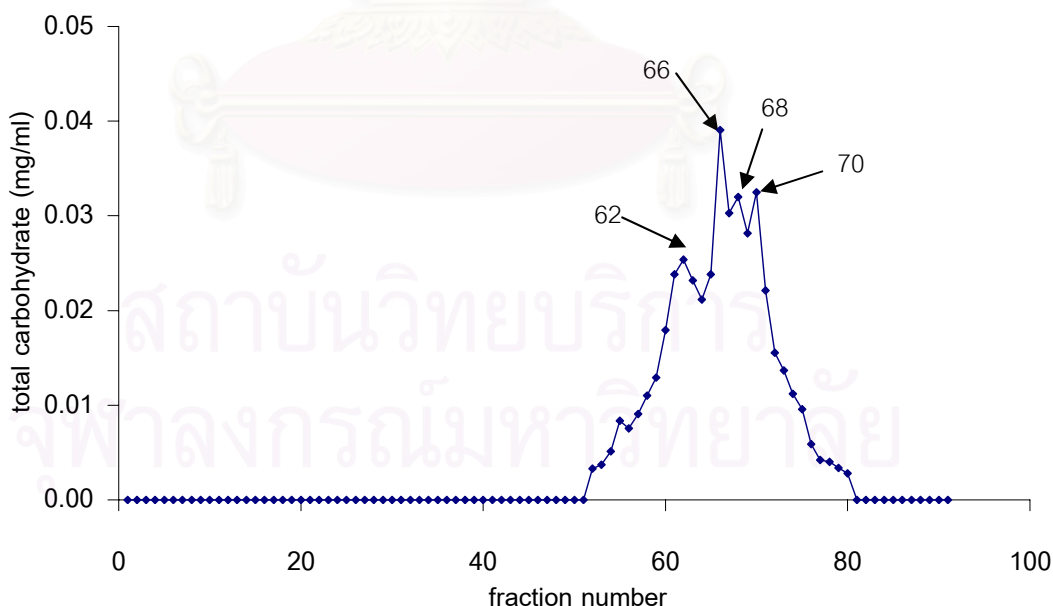
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 หาน้ำหนักโมเลกุลของไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ โดยใช้วิธี Gel Permeation Chromatography

เมื่อทำการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดสามารถเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 55 - 60 กรัมต่อลิตรและมีค่าสมมูลเดกซ์โตรส (DE) เท่ากับ 80 แสดงว่าไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์นี้ยังไม่ใช่สารละลายกลูโคสทั้งหมดซึ่งหมายถึงการย่อยยังเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ อาจมีน้ำตาลตัวอื่น ๆ ปะปนอยู่ด้วยเมื่อนำไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ปรับความเข้มข้นให้เป็น 0.1 กรัมต่อลิตรปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปผ่านการทำ Gel Permeation Chromatography พบว่าไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เมื่อนำไปหาปริมาณ total carbohydrate แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง fraction number กับ ปริมาณ total carbohydrate เกิด peak ทั้งหมด 4 peak ที่ fraction number 62 66 68 และ 70 ดังรูปที่ 9



**รูปที่ 9** ความสัมพันธ์ระหว่าง fraction number กับปริมาณ total carbohydrate ของไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เมื่อผ่านการทำ Gel Permeation Chromatography

โดยสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ จะผ่านเจลออกมาก่อนสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่า และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับกราฟมาตรฐานของสารเดกซ์แทรน (ภาคผนวก ข 7) ซึ่งแสดง fraction number ที่ปรากฏ peak ของสารเดกซ์แทรนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ และกลูโคส ทำให้ทราบว่าทั้ง 4 peak ที่ได้จากการนำเอาไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ไปผ่านการทำ Gel Permeation Chromatography มีน้ำตาลตัวอื่น ๆ นอกจากกลูโคสรวมอยู่ด้วยแต่ทุกตัวมีน้ำหนักโมเลกุลไม่ถึง 1,000 เพราะ fraction number ที่สารเดกซ์แทรนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,000 เกิด peak คือ fraction number ที่ 60 แต่จากการทำ Gel Permeation Chromatography ของไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เกิด peak ที่ fraction number 62 66 68 และ 70 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 634 340 249 และ 182 ตามลำดับดังตารางที่ 9 ซึ่งเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 1,000 จึงหลุดออกมาจาก column ที่หลัง ดังนั้นไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์นี้จึงประกอบด้วยน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ รวมทั้งน้ำตาลที่มีสายสั้น ๆ หรือ oligosaccharides ที่มีกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวไม่เกิน 4 ตัวรวมอยู่กับกลูโคสด้วย ทำให้ค่า DE ที่ได้ไม่เท่ากับ 100 เพราะแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ยังถูกย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสไม่หมดนั่นเองสอดคล้องกับที่กล่าวถึงใน ศิริรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ (2543) ที่กล่าวถ้านำแป้งมาย่อยโดยเอนไซม์ที่ดีที่สุด ปรับปัจจัยต่าง ๆ ให้ดีที่สุด แป้งถูกย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสได้หมดเราจะตรวจวัด DE ได้ 100 ในทางปฏิบัติถือว่าได้สูงกว่า 96 ก็เพียงพอ

ตารางที่ 9 น้ำหนักโมเลกุลของสารที่ออกมาที่ fraction number ต่าง ๆ ของสารละลายไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

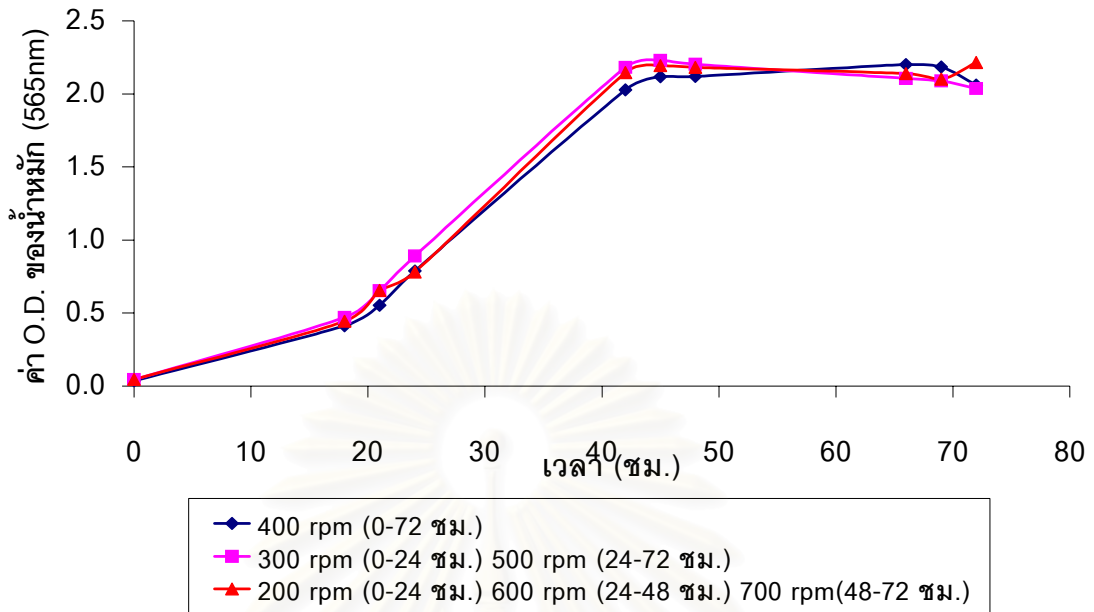
| Fraction number | น้ำหนักโมเลกุล |
|-----------------|----------------|
| 62              | 634            |
| 66              | 340            |
| 68              | 249            |
| 70              | 182            |

#### 4.2 ผลของอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดต่อกระบวนการผลิตแซนแทนกัมแบบขึ้นตอนเดียวในถังหมัก (Batch Fermentation)

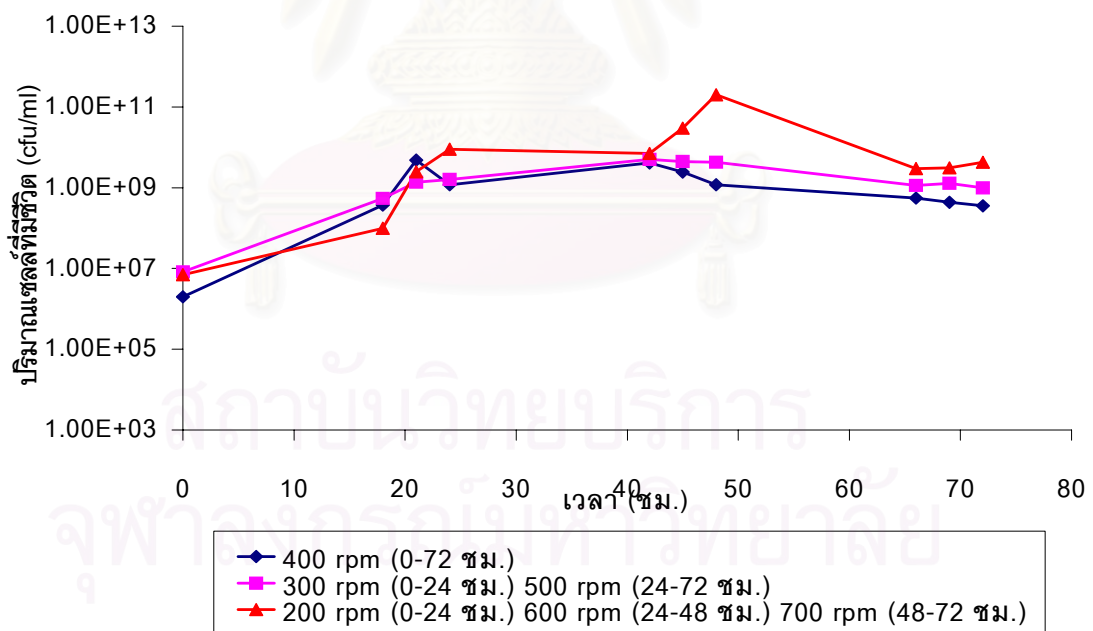
โดยทั่วไปการผลิตแซนแทนกัมจะใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นสารตั้งต้นสำหรับเชื้อในการผลิตแซนแทนกัมแต่จากการทดลองนี้ใช้ไฮโดรไลเซทจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อ *X.campestris* TISTR 840 สามารถใช้ไฮโดรไลเซทจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในการสร้างแซนแทนกัมได้เช่นกัน เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากแหล่งอื่นแทนการใช้กลูโคสบริสุทธิ์ในการผลิตแซนแทนกัม เช่น Baig และคณะ (1990) พบว่า *X. cucurbitae* สามารถสร้างแซนแทนกัมโดยใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนและให้ผลผลิตสูงสุด 7.8 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีแลคโตส 40 กรัมต่อลิตร ส่วน McNeely (1969a,b) รายงานว่าการใช้แป้งข้าวเจ้าที่ผ่านการไฮโดรไลซ์เป็นกลูโคสบางส่วนจะช่วยให้มีการเจริญของเซลล์และการสร้างกัมของ *X. campestris* สูงขึ้น และลดเวลาในการหมักจากเดิม 72 ชั่วโมงซึ่งใช้กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์เหลือ 55 ชั่วโมง รวมทั้งให้ความหนืดสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังเสนอแนะว่าการใช้แป้งหรือรำที่ได้จากเมล็ดธัญพืชอื่น ๆ และพืชตระกูลถั่วมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อควรผ่านการไฮโดรไลซ์มาแล้วบ้างบางส่วน

ผลการติดตามค่า O.D. ของน้ำหมักเมื่อวัดที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร ตลอดระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมงพบว่าไม่แตกต่างกันเลยในทั้ง 3 แบบของการกวนให้อากาศ แสดงดัง รูปที่ 10 โดยในช่วง 18 ชั่วโมงแรกของการหมักค่า O.D. ของน้ำหมักค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยแสดงถึงช่วง lag phase ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องใช้เวลาในการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนที่จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อไปหลังจากนั้นค่า O.D. ก็เริ่มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วแสดงถึงช่วง log phase ที่เชื้อมีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเมื่อสามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจนถึงประมาณชั่วโมงที่ 42 จึงเริ่มมีค่าคงที่ ณ จุดนี้เซลล์มีการเจริญถึงขั้นสูงสุดแล้วการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์มีน้อยลง แหล่งของอาหารและออกซิเจนก็เริ่มที่จะไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพราะมีแต่การใช้ไปเรื่อย ๆ แต่ไม่มีการเพิ่มในส่วนแหล่งอาหารและน้ำหมักก็มีความหนืดมากขึ้นทำให้ปริมาณออกซิเจนที่สามารถละลายได้ในน้ำหมักลดลงจนไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เพราะเนื่องจากเชื้อ *X. campestris* เป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตทำให้ประชากรของเซลล์จุลินทรีย์เริ่มที่จะคงที่ไม่เพิ่มมากขึ้นไปกว่านี้ ซึ่งปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตก็ให้ผลที่มีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกันคือปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งมีแนวโน้มเริ่มคงที่ในช่วงหลังของการหมักแต่อัตราเร็วในการเจริญเติบโตจะแตกต่างกันเล็กน้อย ดังรูปที่ 11 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการหมักจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 21 โดยการกวนให้อากาศแบบที่ 1 เริ่มที่จะมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลงจนกระทั่งครบ 72 ชั่วโมงพบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเหลือน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการกวนให้อากาศ





รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่า O.D. ของน้ำหมัก เมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวในถังหมักปริมาตร 2 ลิตรโดยใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศแบบต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 เมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวในถังหมักปริมาตร 2 ลิตร โดยใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศแบบต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 มีอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

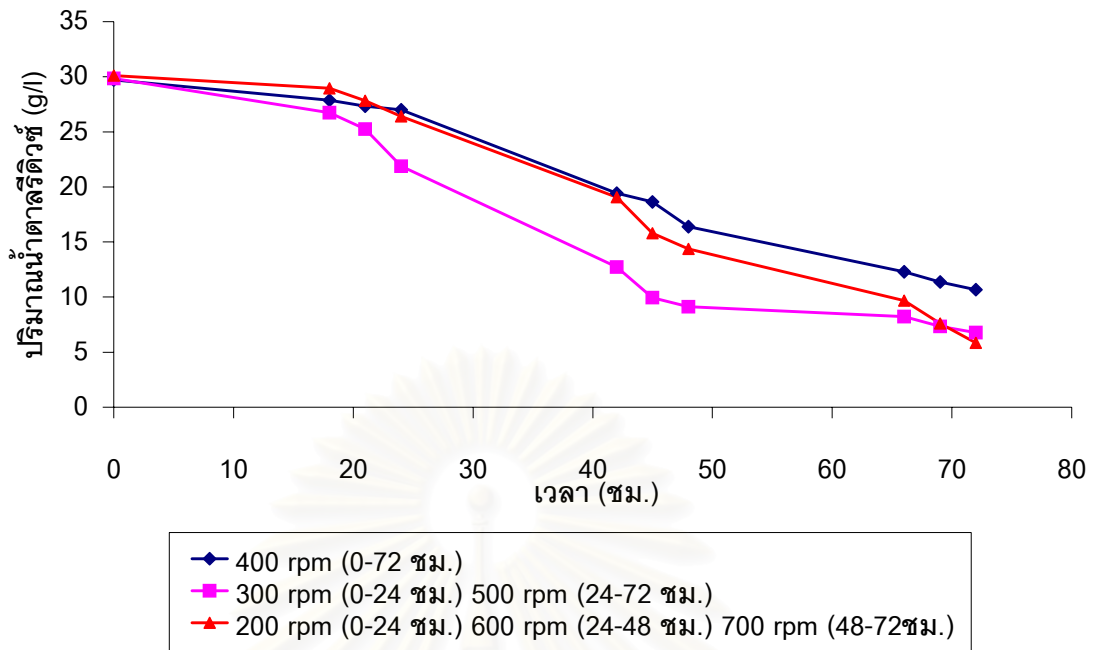
ให้อากาศอีก 2 แบบ การกวนให้อากาศแบบที่ 2 ในช่วง 21 ชั่วโมงแรกมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอย่างรวดเร็วหลังจากนั้นยังคงมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตบ้างเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 48 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มมีจำนวนลดลงและเริ่มคงที่ที่ชั่วโมงที่ 66 จนกระทั่งครบ 72 ชั่วโมง ส่วนการกวนให้อากาศแบบที่ 3 มีอัตราในการเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตตั้งแต่เริ่มต้นการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 48 ซึ่งให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุดและค่อย ๆ ลดลงจนเมื่อครบ 72 ชั่วโมงก็ยังให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการกวนให้อากาศแบบอื่น ๆ ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 30 กรัมต่อลิตร และในช่วง 24 ชั่วโมงแรกการกวนให้อากาศแบบที่ 2 พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ส่วนการกวนให้อากาศแบบที่ 1 และ 3 มีแนวโน้มไม่แตกต่างกันมากนักจนถึงชั่วโมงท้าย ๆ ของการหมักการกวนให้อากาศแบบที่ 2 และ 3 มีการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ใกล้เคียงกันและเมื่อสิ้นสุดการหมักปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการกวนให้อากาศแบบที่ 3 ก็ลดลงต่ำกว่าการกวนให้อากาศแบบที่ 2 ดังรูปที่ 12 โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการหมักของการกวนให้อากาศแบบที่ 1 2 และ 3 เท่ากับ 10.68 6.77 และ 5.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การใช้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 64.07 77.33 และ 80.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 10 แสดงว่าการกวนให้อากาศแบบที่ 3 เชื้อมีการนำเอาน้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้ในกระบวนการสร้างแชนแทนกัมได้มากกว่าการหมักที่ใช้การกวนให้อากาศแบบอื่น ๆ โดยเฉพาะในช่วงหลังของการหมัก เนื่องจากมีการกวนให้อากาศด้วยความเร็วรอบที่สูงกว่าแบบอื่น ๆ

**ตารางที่ 10** % การใช้น้ำตาลรีดิวซ์เมื่อสิ้นสุดการหมักแบบขั้นตอนเดียวโดยใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศแบบต่าง ๆ

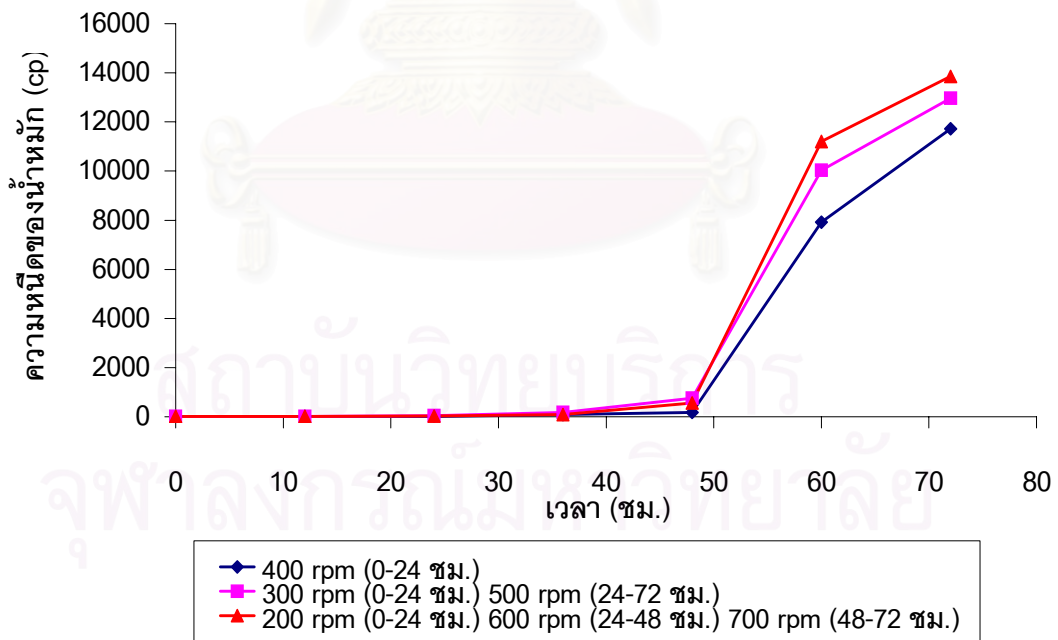
| อัตราเร็วในการกวนให้อากาศ   | % การใช้น้ำตาลรีดิวซ์    |
|---|--------------------------|
| 1. 400 rpm (0-72 ชม.)   | 64.07 <sup>a</sup> ±1.89 |
| 2. 300 rpm (0-24 ชม.) และ 500 rpm (24-72 ชม.)                     | 77.33 <sup>b</sup> ±3.62 |
| 3. 200 rpm (0-24 ชม.) 600 rpm (24-48 ชม.) และ 700 rpm (48-72 ชม.) | 80.55 <sup>b</sup> ±3.69 |

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

จากรูปที่ 13 จะเห็นได้ว่าน้ำหมักมีความหนืดเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นและในช่วงแรก ๆ หรือประมาณ 24 ชั่วโมงแรกน้ำหมักจะมีความหนืดน้อยมากแทบไม่แตกต่างกันในทุก ๆ แบบของการกวนให้อากาศของใบพัดแต่หลังจากชั่วโมงที่ 24 เมื่อเริ่มมีการเพิ่มความเร็วยกใน



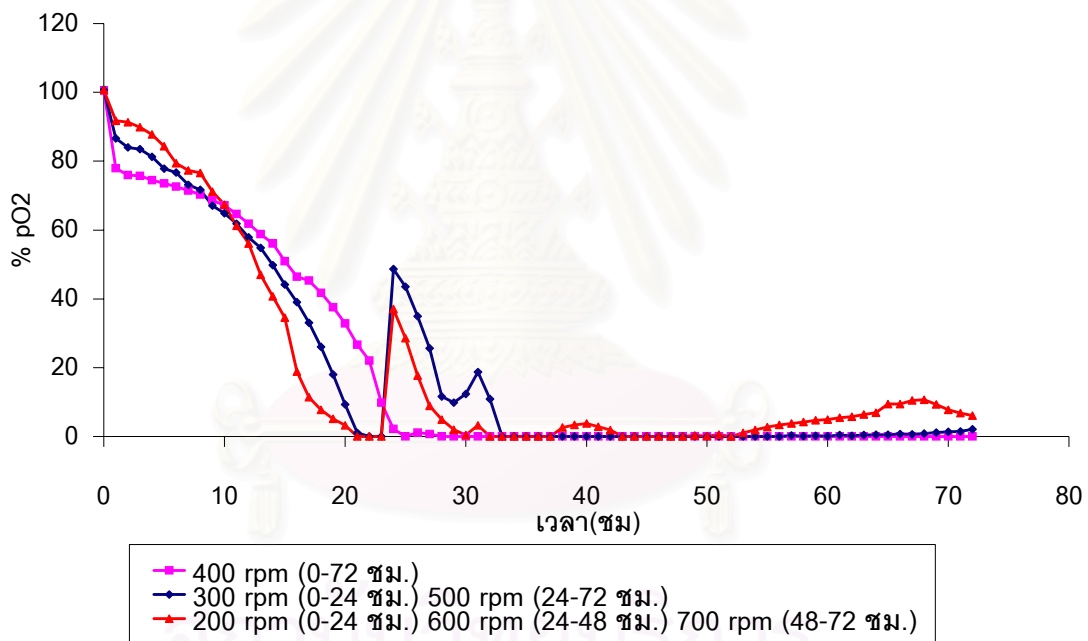
รูปที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณน้ำตาลที่ละลายในน้ำหมักเมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวในถังหมักปริมาตร 2 ลิตร โดยใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศแบบต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 มีอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความหนืดของน้ำหมักเมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวในถังหมักปริมาตร 2 ลิตร โดยใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศแบบต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 มีอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การกวนให้อากาศทั้งแบบที่ 2 และ 3 แล้ว น้ำหมักที่ได้จากการกวนให้อากาศแต่ละแบบเริ่มมีความหนืดเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จนสังเกตเห็นความเปลี่ยนแปลงและความแตกต่างเล็กน้อยโดยการกวนให้อากาศแบบที่ 2 จะให้ความหนืดเพิ่มสูงกว่าแบบอื่น ๆ แต่หลังจากชั่วโมงที่ 48 ไปแล้ว น้ำหมักมีการเปลี่ยนแปลงของความหนืดเพิ่มขึ้นในอัตราเร็วที่ค่อนข้างสูงโดยเฉพาะน้ำหมักที่มีการกวนให้อากาศแบบที่ 3 ซึ่งมีการเพิ่มความเร็วยกจาก 600 รอบต่อนาทีเป็น 700 รอบต่อนาที ในการกวนให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นมา มีความหนืดสูงขึ้นอย่างรวดเร็วมากกว่าแบบที่ 1 และ 2 นอกจากนี้ยังพบว่า การกวนให้อากาศแบบที่ 1 ให้ค่าความหนืดของน้ำหมักน้อยกว่าแบบอื่น ๆ ในทุก ๆ ชั่วโมงของการหมักอาจเป็นเพราะการกวนให้อากาศของใบพัดแบบที่ 1 ค่อนข้างต่ำกว่าแบบอื่น ๆ และไม่เหมาะสมกับการผลิตแซนแทนกัมในช่วงท้าย ๆ ของการหมักที่น้ำหมักมีความหนืดเพิ่มสูงขึ้น จะเห็นได้ว่าอัตราเร็วในการกวนให้อากาศที่สูง ๆ ในช่วงที่น้ำหมักมีความหนืดมากจะมีผลต่อกระบวนการผลิตแซนแทนกัมให้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากมีการถ่ายเทของออกซิเจนมากขึ้นทำให้เชื้อสามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมงพบว่า น้ำหมักที่ได้จากการกวนให้อากาศแบบที่ 1 2 และ 3 ให้ความหนืดเท่ากับ 11,720 12,960 และ 13,860 เซนติพอยซ์ตามลำดับ ในส่วนของปริมาณออกซิเจนที่สามารถละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. campestris* ซึ่งเป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญ เมื่อตอนเริ่มต้นของการทดลองได้ตั้งค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้เอาไว้ที่ 100 เปอร์เซ็นต์หรือ %  $pO_2$  เท่ากับ 100 โดยในช่วง 24 ชั่วโมงแรกพบว่า %  $pO_2$  ในอาหารเลี้ยงเชื้อแปรผกผันกับความเร็วยกในการกวนให้อากาศของใบพัด กล่าวคือที่ความเร็วยกในการกวนให้อากาศต่ำ ๆ อัตราเร็วในการลดลงของ %  $pO_2$  จะสูงเนื่องจากมีการถ่ายเทของออกซิเจนต่ำกว่าการกวนให้อากาศที่ความเร็วยกที่สูงกว่า ซึ่งพบว่าในทุก ๆ แบบของการกวนให้อากาศมี %  $pO_2$  ลดลงจนมีค่าเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ประมาณชั่วโมงที่ยี่สิบเศษ ๆ ทั้งนี้เป็นผลมาจากความหนืดที่เพิ่มขึ้นจนทำให้ออกซิเจนมีความสามารถในการละลายลงไปให้น้ำหมักได้น้อยลงนั่นเอง ซึ่งสอดคล้องกับค่าความหนืดของน้ำหมักที่มีค่าความหนืดเพิ่มสูงขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 24 โดยการกวนให้อากาศแบบที่ 1 (400 รอบต่อนาทีตลอดการทดลอง) %  $pO_2$  มีค่าลดลงจนเหลือ 0 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 25 และหลังจากนี้ก็ยังมีค่าเป็นศูนย์ตลอดระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ไม่มีการเพิ่มขึ้นอีกเลย การกวนให้อากาศแบบที่ 2 ซึ่ง 24 ชั่วโมงแรกมีการกวนให้อากาศ 300 รอบต่อนาที พบว่า %  $pO_2$  ลดลงจนมีค่าเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 22 หลังจากนั้นมีการเพิ่มความเร็วยกในการกวนให้อากาศเป็น 500 รอบต่อนาทีจนกระทั่งสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง ทำให้ %  $pO_2$  สามารถละลายเพิ่มได้มากขึ้นจนมีค่าเท่ากับ 48.7 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น %  $pO_2$  ก็มีค่าลดลง เรื่อย ๆ ตามระยะเวลาการหมักจนกระทั่งชั่วโมงที่ 33 จึงมีค่าเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ และในช่วงท้าย ๆ ของการหมักพบว่า %  $pO_2$  มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยคือเท่ากับ 0.3 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 57 และเมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง

% pO<sub>2</sub> มีค่าเท่ากับ 2.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการรวนให้อากาศแบบที่ 3 ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกที่ทำให้ความเร็วรอบในการรวนให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที พบว่า % pO<sub>2</sub> มีการลดลงเร็วที่สุดเมื่อเทียบกับการรวนให้อากาศแบบอื่น ๆ และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 21 % pO<sub>2</sub> จึงมีค่าเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการเพิ่มความเร็วรอบในการรวนให้อากาศเป็น 600 รอบต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 - 48 พบว่า % pO<sub>2</sub> มีค่าสูงขึ้นจนถึง 37 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 24 และมีค่าลดลงเรื่อย ๆ จนเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 32 หลังจากนั้นก็มีค่าเพิ่มขึ้นและลดลงเล็กน้อยสลับไปมาจนมีค่าเป็นศูนย์อีกครั้งที่ชั่วโมงที่ 43 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 ได้ทำการเปลี่ยนความเร็วรอบในการรวนให้อากาศเป็น 700 รอบต่อนาที แต่ % pO<sub>2</sub> ก็ยังไม่เพิ่มขึ้นทันทีเนื่องจากน้ำหมักเริ่มมีความหนืดมากจนการเคลื่อนที่ของน้ำหมักเป็นไปอย่างช้า ๆ จนกระทั่งชั่วโมงที่ 53 % pO<sub>2</sub> จึงเพิ่มขึ้นและค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีค่าสูงสุดเท่ากับ 10.7 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 68 และค่อย ๆ ลดลงจนเหลือ 6.1 เปอร์เซ็นต์เมื่อถึงชั่วโมงที่ 72 ดังรูปที่ 14



**รูปที่ 14** ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ % pO<sub>2</sub> เมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวในถังหมัก ปริมาตร 2 ลิตร โดยใช้อัตราเร็วในการรวนให้อากาศแบบต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 มีอัตรากรให้อากาศ 0.5 vvm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ดังนั้นจะเห็นว่าการใช้ความเร็วรอบในการรวนให้อากาศในช่วง 24 ชั่วโมงแรกที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีซึ่งเป็นความเร็วรอบที่ต่ำที่สุดของการทดลองเป็นการช่วยประหยัดพลังงานในช่วงแรกของการหมักได้ดีเนื่องจากไม่ว่าจะใช้ความเร็วรอบ 300 หรือ 400 รอบต่อนาทีในช่วง 24 ชั่วโมงแรก % pO<sub>2</sub> ในน้ำหมักก็มีค่าลดลงจนเป็นศูนย์ที่ชั่วโมงใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันมากนัก อีกทั้งน้ำหมักยังมีความหนืดที่ต่ำมากทำให้ความเร็วรอบในการรวนให้อากาศที่ 200 รอบต่อนาที

สามารถทำให้ออกซิเจนละลายในน้ำหมักได้เพียงพอต่อความต้องการในการใช้ออกซิเจนของเซลล์ เท่า ๆ กับที่ความเร็วรอบ 300 และ 400 รอบต่อนาทีเช่นกัน และหลังจาก 24 ชั่วโมงแรกไปแล้ว หมักเริ่มมีความหนืดสูงขึ้นเนื่องจากการสร้างกัมของเซลล์ ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศที่สูงขึ้นจึงมีผลเป็นอย่างมาก เพราะฉะนั้นที่อัตราเร็วในการกวนให้อากาศ 400 รอบต่อนาทีตลอดการหมัก 72 ชั่วโมงโดยไม่มีการเปลี่ยนความเร็วรอบให้สูงขึ้นเลยนั้นจะทำให้ น้ำหมักมีการเคลื่อนที่ได้ น้อยการละลายของอากาศสู่น้ำหมักก็ลดลงจนไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ส่งผลให้ การสร้างแซนแทนลดลง ความหนืดของน้ำหมักจึงเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด ส่วนการหมักที่ใช้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศแบบที่ 2 นั้น หลังจากที่ใช้ความเร็วรอบในการให้อากาศ 300 รอบต่อ นาทีจนครบ 24 ชั่วโมงซึ่ง %  $pO_2$  ลดลงจนเป็นศูนย์แล้วนั้น เมื่อมีการเพิ่มความเร็วรอบเป็น 500 รอบต่อนาที %  $pO_2$  ก็เพิ่มขึ้นมากอย่างเห็นได้ชัดทำให้เชื้อมีการสร้างกัมเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับ ความหนืดในช่วง 24-48 ชั่วโมงที่การกวนให้อากาศแบบที่ 2 มีความหนืดเพิ่มขึ้นสูงที่สุด แต่ หลังจาก 48 ชั่วโมงไปแล้ว น้ำหมักมีความหนืดเพิ่มขึ้นเร็วมากจนการกวนให้อากาศที่ 500 รอบต่อ นาทีทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้มีไม่เพียงพอต่อความต้องการออกซิเจนของเซลล์สำหรับ นำไปใช้ในการสร้างแซนแทนกัม จะเห็นได้จากรูปที่ 14 ว่า %  $pO_2$  เมื่อสิ้นสุดการหมักของการกวนให้อากาศแบบที่ 3 มีค่ามากกว่าการกวนให้อากาศแบบที่ 2 ทำให้ความหนืดเมื่อสิ้นสุดการหมัก น้อยกว่าการกวนให้อากาศแบบที่ 3 ที่มีการเพิ่มความเร็วรอบในการกวนให้อากาศช่วง 48-72 ชั่วโมง ความหนืดของน้ำหมักที่มีการกวนให้อากาศแบบที่ 3 จึงสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การกวนให้อากาศแบบอื่น ๆ

เมื่อทำการตกตะกอนน้ำหมักเมื่อทำการหมักครบ 72 ชั่วโมงพบว่า การกวนให้อากาศแบบที่ 3 ให้ % crude xanthan สูงที่สุดคือเท่ากับ 2.23 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับความหนืดของน้ำหมัก ที่เพิ่มสูงที่สุดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากการกวนให้อากาศแบบที่ 2 คือ เท่ากับ 1.92 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการกวนให้อากาศของใบพัดแบบที่ 1 ให้ % crude xanthan น้อยที่สุด คือเท่ากับ 1.84 เปอร์เซ็นต์ แต่ก็ไม่แตกต่างจากการกวนให้อากาศแบบที่ 2 เช่นกัน ดังตารางที่ 11

**ตารางที่ 11** % crude xanthan เมื่อสิ้นสุดการหมักแบบขั้นตอนเดียวโดยใช้อัตราเร็วในการกวนให้อากาศแบบต่าง ๆ

| อัตราเร็วในการกวนให้อากาศ   | % crude xanthan          |
|---|--------------------------|
| 1. 400 rpm (0-72 ชม.)   | 1.84 <sup>a</sup> ±0.19  |
| 2. 300 rpm (0-24 ชม.) และ 500 rpm (24-72 ชม.)                     | 1.92 <sup>ab</sup> ±0.17 |
| 3. 200 rpm (0-24 ชม.) 600 rpm (24-48 ชม.) และ 700 rpm (48-72 ชม.) | 2.23 <sup>b</sup> ±0.22  |

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

จากตารางที่ 11 แสดงว่าอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของใบพัดแบบที่ 3 เป็นแบบที่เหมาะสมที่สุดเพราะทำให้ได้ปริมาณของ crude xanthan สูงที่สุดเมื่อเทียบกับการกวนให้อากาศแบบอื่น ๆ เพราะมีการเพิ่มความเร็วยกขึ้นในการกวนให้อากาศแต่ละช่วงที่เหมาะสมต่อความต้องการออกซิเจนของเชื้อเพื่อให้เชื้อนำไปใช้ในการดำรงชีวิตเพื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนไปเป็นแซนแทนกัมและน้ำหมักมีความหนืดที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก ความเร็วยกขึ้นในการกวนให้อากาศช่วงที่น้ำหมักมีความหนืดเพิ่มขึ้นควรจะสูงกว่าการใช้ความเร็วยกในช่วงแรก ๆ ของการหมักที่น้ำหมักยังไม่มีเปลี่ยนแปลงของความหนืดเกิดขึ้น การถ่ายเทของปริมาณออกซิเจนในช่วงท้าย ๆ ของการหมักก็เกิดขึ้นได้ยากเนื่องจากมีความหนืดเป็นตัวจำกัดแต่ปริมาณ crude xanthan ที่ตกตะกอนออกมานั้นไม่ใช่แซนแทนเพียงอย่างเดียวเนื่องจากเอธานอลสามารถที่จะตกตะกอนสารโพลิโกแซคคาไรด์ได้เช่นกัน (Gonzales et al., 1989) โดยจากการทดลองนำเอาไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยเอธานอลพบว่า มีตะกอนเล็ก ๆ ขาวขุ่นลอยอยู่เหนือผิวหน้าสารละลายเล็กน้อยแต่ไม่จับตัวกันเป็นก้อนชัดเจนและลักษณะสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสารละลายใสเป็นขาวขุ่น ดังนั้นเมื่อนำน้ำหมักมาตกตะกอนด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักตะกอนที่ตกออกมาจึงเป็นน้ำหนักของแซนแทนที่เชื้อผลิตได้รวมอยู่กับน้ำหนักของตะกอนพวกโพลิโกแซคคาไรด์ที่มีอยู่ในไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ที่ยังเหลืออยู่เมื่อสิ้นสุดการหมักตกตะกอนลงมาพร้อมกันแต่จากการสังเกตตะกอนที่ตกลงมาได้พบว่าตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนไฮโดรไลเซทจะมีลักษณะขาวขุ่นไม่จับตัวกันเป็นก้อนจะกระจายลอยตัวบนผิวหน้าของสารละลายแต่ตะกอนส่วนใหญ่ที่ได้หลังจากตกตะกอนน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการทดลองจะเป็นตะกอนที่จับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนใหญ่ ๆ ไม่แยกเป็นเศษ ๆ เล็กเศษน้อยและสีของตะกอนจะมีสีเหลืองอ่อน ๆ ไม่ขาวขุ่นเหมือนตะกอนของไฮโดรไลเซทแสดงว่าสิ่งที่ตกตะกอนออกมาส่วนใหญ่เป็นแซนแทนกัม ดังนั้น crude xanthan ที่ได้จากการทดลองนี้จึงมีการปนเปื้อนของตะกอนที่ได้จากไฮโดรไลเซทบ้างเล็กน้อย โดยปกติแล้วแซนแทนกัมเมื่อละลายน้ำจะสามารถละลายและคงตัวอยู่ได้เนื่องจากแรงกระทำทางไฟฟ้าระหว่างไอออนลบบนสายแซนแทนกัมและไอออนบวกของน้ำ และเมื่อเติมเอธานอลซึ่งเป็นสาร dehydrating agent จะทำให้เกิดการรบกวนสมดุลไอออนทำให้แซนแทนกัมแยกตัวออกจากน้ำหรือกล่าวได้ว่า เอธานอลทำให้ค่า dielectric constant ซึ่งเป็นค่าความสามารถของตัวทำละลายที่ทำให้ตัวถูกละลายสามารถละลายได้ในตัวทำละลายนั้น ๆ ของสารละลายแซนแทนกัมลดลง (Gonzales et al., 1989)

ผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับ Amanullah, Serrano และคณะ (1998) ที่กล่าวว่าสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงพอและแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมมีผลต่อ mass transfer, nutrient feed และ homogenization ทำให้มีการขับแซนแทนออกนอกเซลล์อย่างต่อเนื่อง

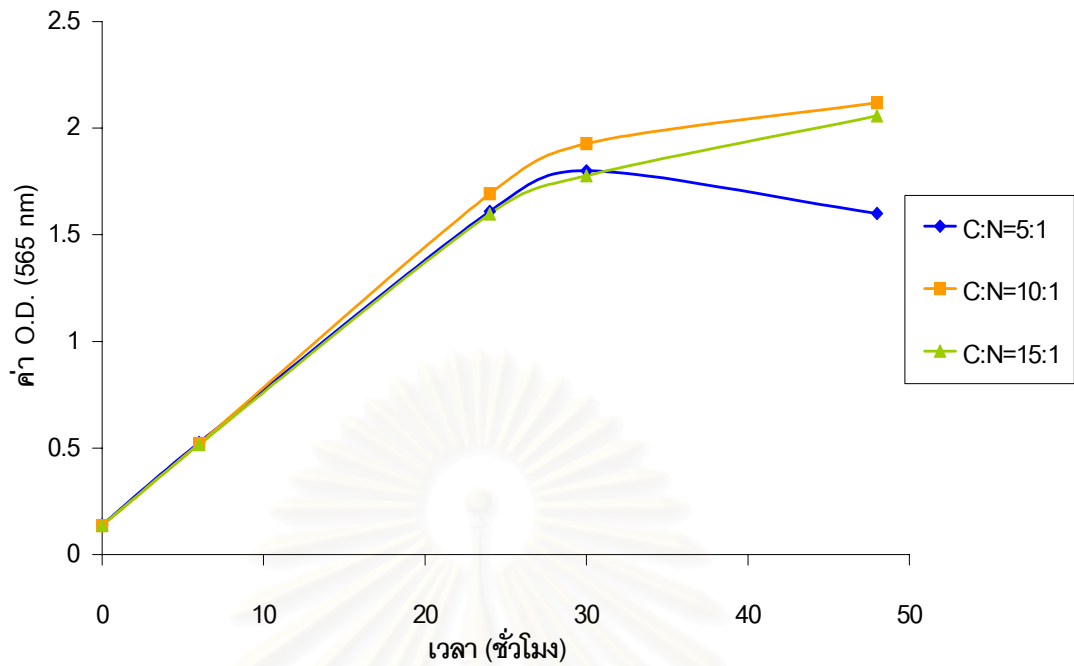
จนกระทั่งเกิดการยับยั้งโดยบาง form ของตัวผลิตภัณฑ์เอง และการ mixing ที่ไม่เพียงพอจะทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์เพราะเมื่อความหนืดเพิ่มขึ้นจะไปขัดขวางการแพร่กระจายของออกซิเจนทำให้เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลเพื่อการผลิตแซนแทนกัมได้อย่างสมบูรณ์ (De Vuyst et al., 1987) Asim และ Ghosh (1999) ได้ทำการทดลองแบบ batch fermentation พบว่าเมื่อ specific xanthan productivity ลดลงเพราะมีการจำกัดการถ่ายเทออกซิเจนด้วยความหนืดของน้ำหมักสามารถแก้ไขได้โดยเพิ่มความเร็วในการกวนจาก 600 รอบต่อนาที เป็น 1,000 รอบต่อนาที แม้ว่าการเจริญของเซลล์จะไม่แตกต่างกันแต่ yield ของแซนแทนเพิ่มขึ้นเนื่องจากออกซิเจนที่เพิ่มขึ้น และ Peter และคณะ (1989) รายงานถึงผลการทดลองศึกษาอิทธิพลของอัตราเร็วในการกวนของไบพาย (agitation rate) ต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตแซนแทนกัมในถังหมักขนาด 15 ลิตร ที่มีการให้อากาศ 0.33 ปริมาตรต่อลิตรต่อนาที โดยทำการแปรความเร็วของการกวนของไบพาดั้งแต่ 200 ถึง 800 รอบต่อนาที พบว่าอัตราเร็วในการกวนที่ 200 รอบต่อนาทีทำให้การเจริญของเซลล์ต่ำสุดและให้ผลผลิตลดลงเกือบ 3 เท่า ส่วนที่ความเร็วการกวน 400 รอบต่อนาที จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกัมพอ ๆ กับการกวนที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที แสดงว่าการผลิตแซนแทนกัมสูงขึ้นเมื่อใช้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศสูงขึ้นซึ่งชี้ให้เห็นว่าอัตราการสร้างแซนแทนขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจน เนื่องจากกระบวนการผลิตแซนแทนกัมจำเป็นต้องมีออกซิเจนที่เพียงพอเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic conditions) การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนให้อากาศของไบพาดสามารถช่วยให้ออกซิเจนละลายได้มากขึ้นเมื่อน้ำหมักมีความหนืดสูงขึ้นและยังช่วยในเรื่องของการถ่ายเทมวลของก๊าซและของเหลวในน้ำหมักอีกด้วย เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกวนให้อากาศที่อัตราสูงขึ้นเรื่อย ๆ นอกจากจะพบว่ามีการถ่ายเทมวลของออกซิเจนสูงขึ้นแล้วปริมาณเซลล์ที่บอดเจ็บก็เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Casas et al., 2000) Cadmus และคณะ (1978) ศึกษาอัตราการให้อากาศในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่าอากาศมีผลต่อการผลิตโพลีแซคคาไรด์ เมื่อปรับอัตราการให้อากาศเป็น 0.75 ปริมาตรต่อลิตรต่อนาที จะให้กัมที่มีปริมาณกรดไพรูวิกสูงสุด การให้อัตราการให้อากาศสูงขึ้นจะลดเวลาของการหมักที่ให้ผลผลิต แซนแทนกัมสูงสุดได้เร็วขึ้น ในกระบวนการหมักแบบขั้นตอนเดียวการเพิ่มขึ้นของความหนืดของน้ำหมักเนื่องจากการถ่ายเทของออกซิเจนถูกจำกัดจะส่งผลให้เกิดการสะสมของเสียภายในเซลล์ซึ่งจะไปยับยั้งกระบวนการสร้างแซนแทนและ TCA Cycle โดย TCA Cycle ที่ถูกยับยั้งจะมีผลต่อการสังเคราะห์แซนแทน (Vashitz and Sheintuch, 1991) และลดการสังเคราะห์ของ precursors ต่าง ๆ ของโมเลกุลที่จำเป็นต่อการเจริญ เซลล์จึงไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้และทำให้การสังเคราะห์แซนแทนลดลง โดยปกติแล้วเชื้อจะใช้ออกซิเจนเพื่อสังเคราะห์สร้างเซลล์ใหม่และสังเคราะห์ พลังงานเพื่อใช้ในการดำรงชีวิตและการสร้างแซนแทนกัม (Jana and Ghosh, 1995)



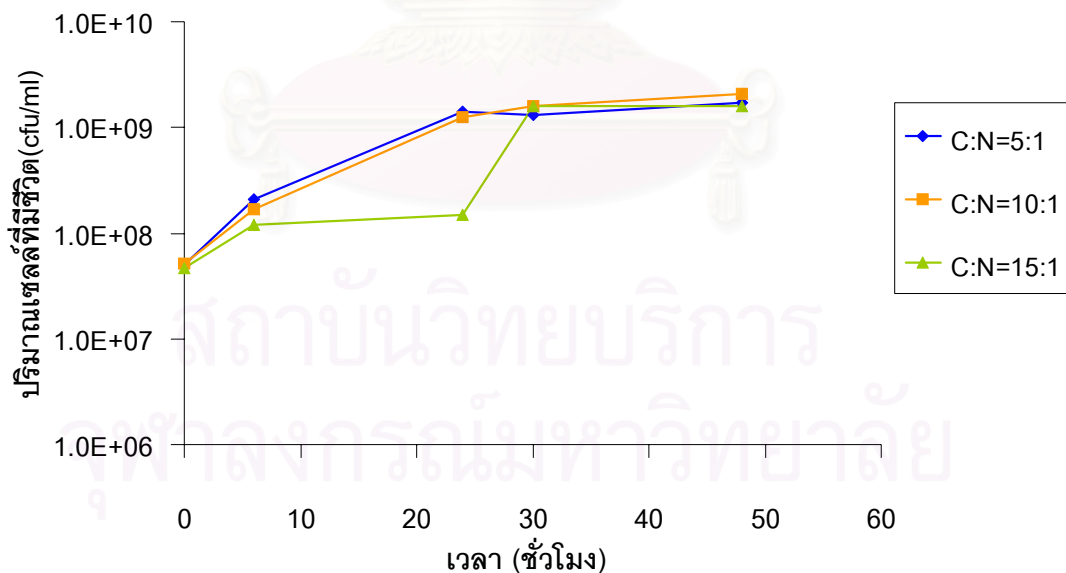
### 4.3 ศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต แซนแทนกัมของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840

#### 4.3.1 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840

เมื่อติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 โดยการวัดค่า O.D. ของน้ำหมักที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร พบว่าในช่วงต้น ๆ ของการหมักการเจริญเติบโตของเชื้อในน้ำหมักที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 10:1 เริ่มมีอัตราการการเจริญเติบโตของเชื้อสูงกว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 และ 15:1 ขึ้นเรื่อย ๆ และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 24 การเจริญของเชื้อในทุก ๆ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีการเจริญเติบโตช้าลงจนเริ่มคงที่โดยที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 มีแนวโน้มในการเจริญเติบโตของเชื้อลดลงเมื่อทำการหมักต่อไป ทำให้ค่า O.D. มีแนวโน้มลดลง ส่วนที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 และ 15:1 เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อยโดยที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 ยังเป็นอัตราส่วนที่เชื้อมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดตลอดระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ดังรูปที่ 15 สำหรับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) เมื่อทำการเพาะเชื้อที่เวลาต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสูตร YM พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 24 ก็เริ่มจะคงที่ โดยที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 และ 10:1 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่ชั่วโมงที่ 24 ไม่แตกต่างกันแต่สูงกว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15:1 มาก ทั้ง ๆ ที่ค่า O.D. ของที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 และ 15:1 มีค่าใกล้เคียงกันมากในช่วง 24 ชั่วโมงแรก แต่ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15:1 มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตค่อนข้างช้าและมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตน้อยกว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าอื่น ๆ ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกแต่ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นขึ้นในชั่วโมงที่ 30 สอดคล้องกับค่า O.D. ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 ในขณะที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 ค่า O.D. มีแนวโน้มลดลง ซึ่งในชั่วโมงที่ 30 นี้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 และ 10:1 เริ่มมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตคงที่แล้ว ดังรูปที่ 16 แสดงว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15:1 เป็นอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่สูงเกินไปจึงไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในช่วงแรก ๆ ของการหมัก สอดคล้องกับรายงานของ Amanullah, Satti และ Nienow (1998) ที่กล่าวว่าไนโตรเจนจะมีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรียแต่ไม่ค่อยมีความสำคัญในช่วงการผลิตแซนแทน ดังนั้นอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ ๆ จะเป็นที่ต้องการในช่วงแรกที่เชื้อมีการเจริญเติบโตเพื่อให้เกิดความเข้มข้นของเซลล์ที่สูง ๆ

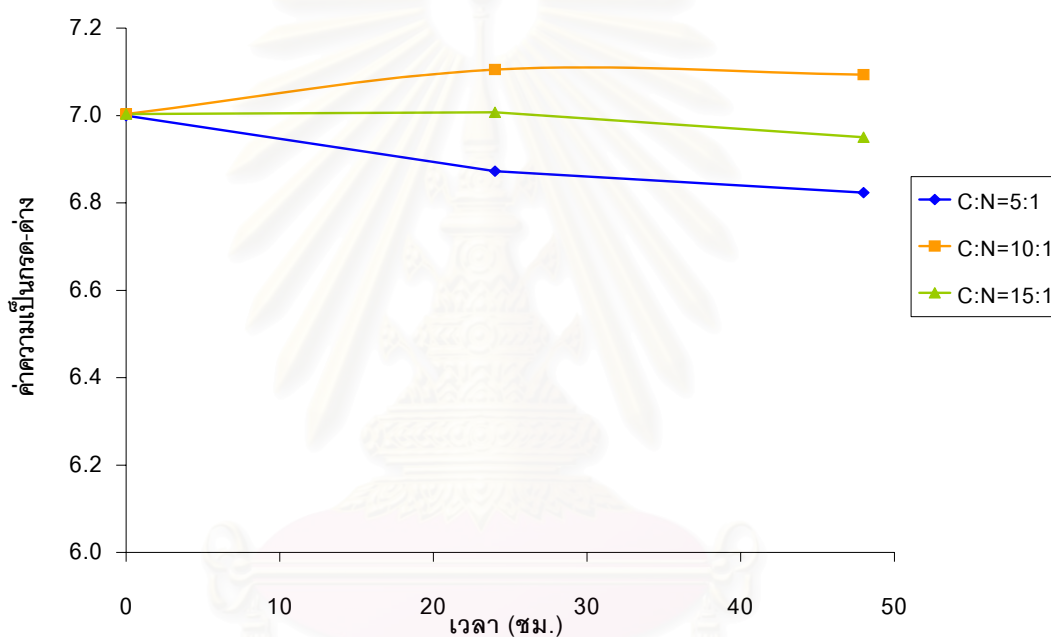


รูปที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ ค่า O.D. ของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหารที่มี C: N เท่ากับ 5:1 10:1 และ 15:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหารที่มี C:N เท่ากับ 5:1 10:1 และ 15:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจากค่าเริ่มต้น ดังรูปที่ 17 โดยที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 มีค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ที่อัตราส่วน 10:1 ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลงในปริมาณที่น้อยมากและที่อัตราส่วน 15:1 มีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงมากกว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าอื่น ๆ แต่ก็ไม่มากนักเมื่อเทียบกับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เมื่อครบ 48 ชั่วโมงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 10:1 และ 15:1 มีค่าเท่ากับ 7.09 6.95 และ 6.82 ตามลำดับ



**รูปที่ 17** ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหารที่มี C: N เท่ากับ 5:1 10:1 และ 15:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่วัดในรูปน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไปจนเกือบหมดในทุกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 10:1 และ 15:1 และในแต่ละค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไปก็ไม่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 12 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 95.00 94.50 และ 95.55 เปอร์เซ็นต์ตามอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 10:1 และ 15:1 ตามลำดับ แสดงว่าเชื้อมีการใช้แหล่งคาร์บอนได้ค่อนข้างสมบูรณ์

พิจารณา % cell dry weight ที่ได้หลังจากที่ทำการหมักเชื้อแบบเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดที่ต้องการศึกษาพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15:1 ให้ % cell dry weight เท่ากับ 0.136 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีค่าสูงที่สุดแต่ไม่แตกต่างจากที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 ที่ให้ % cell dry weight เท่ากับ 0.129 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 ให้ % cell dry weight เท่ากับ 0.097 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยที่สุดและแตกต่างจากที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าอื่น ๆ ดังตารางที่ 12 ดังนั้นเราจึงเลือกใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 ในการศึกษาขั้นต่อไป เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตในการลดปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ ถึงแม้ว่าจะให้ % cell dry weight น้อยกว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15:1 ก็ตาม เพราะเนื่องจากที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 ให้ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ของ % cell dry weight ไม่แตกต่างกันจากที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15:1 นอกจากนี้ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15:1 ยังให้ค่าความหนืดของน้ำหมักเท่ากับ 19.43 เซนติพอยซ์ ซึ่งน้อยกว่าและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 ที่ให้ความหนืดของน้ำหมักเท่ากับ 19.68 เซนติพอยซ์ อีกด้วย ดังตารางที่ 12 และที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 ก็ให้ค่าความหนืดของน้ำหมักเท่ากับ 12.40 เซนติพอยซ์ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 และ 15:1 เช่นกัน ดังตารางที่ 12

**ตารางที่ 12** % น้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป % cell dry weight และความหนืดของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 10:1 และ 15:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| อัตราส่วน C:N | % น้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป   | % cell dry weight         | ความหนืดของน้ำหมัก (cp)   |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 5:1           | 95.00 <sup>ns</sup> ±0.52 | 0.097 <sup>a</sup> ±0.008 | 12.40 <sup>ns</sup> ±2.83 |
| 10:1          | 94.50 <sup>ns</sup> ±0.97 | 0.129 <sup>b</sup> ±0.014 | 19.68 <sup>ns</sup> ±3.08 |
| 15:1          | 95.55 <sup>ns</sup> ±0.19 | 0.136 <sup>b</sup> ±0.015 | 19.43 <sup>ns</sup> ±6.37 |

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

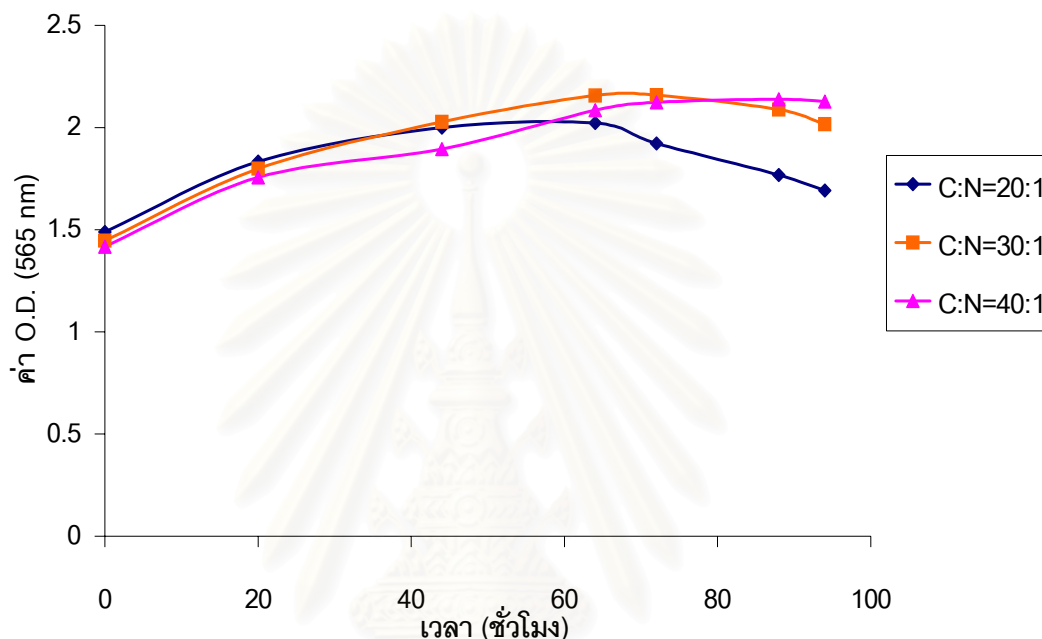
ns ตัวเลขที่มีอักษรกำกับจากแถวตั้งเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ )

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5:1 และ 15:1 นั้น อาจจะเป็นอัตราส่วนที่ต่ำและสูงเกินไปจนไม่เหมาะสมสำหรับช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโตเพราะในช่วงแรกที่เชื้อมีการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ก่อนที่จะมีการสร้างแกนแทนกัมนั้น อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนควรจะมีค่าต่ำ เพราะในช่วงนี้ไนโตรเจนมีผลอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แต่ปริมาณของคาร์บอนไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และถ้ามีปริมาณของคาร์บอนมากเกินไป อาจจะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้เช่นกัน โดยปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะให้เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตรเพราะเป็นค่าที่ธันยาภรณ์ นาวินวรณ (2542) ได้ทำการทดลองแล้วพบว่าเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตแกนแทนกัมมากที่สุด ดังปรากฏในภาคผนวก ก 3 ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่มีการปรับปรุงปริมาณไนโตรเจนแล้ว นอกจากนี้ Godet (1973) ยังกล่าวว่าไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ถ้ามีไนโตรเจนมากเกินไปจะไปลดประสิทธิภาพในการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็น polysaccharide (Whistler และ Bemiller, 1973) ซึ่งมีความเห็นสอดคล้องกับ Souw และ Demain (1979) อีกด้วย Jana และ Ghosh (1995) ได้รายงานไว้ในระบบเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนสูง ไนโตรเจนและน้ำตาลกลูโคสจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์ของเชื้อและเชื้อจะใช้น้ำตาลกลูโคสส่วนหนึ่งในการดำรงชีวิตแต่หากระบบมีไนโตรเจนต่ำน้ำตาลกลูโคสส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในการสร้างแกนแทนกัมและมีน้ำตาลกลูโคสเพียงบางส่วนถูกใช้ในการดำรงชีวิตของเชื้อ

#### 4.5.2 ผลการศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแกนแทนกัม

หลังจากที่ศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ได้แล้วคืออาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 นำน้ำหมักที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อแยกเอาเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง (ธันยาภรณ์ นาวินวรณ, 2540) ที่แปรอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 20:1 30:1 และ 40:1 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อวัดค่า O.D. ของน้ำหมักที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร พบว่าค่า O.D. ยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นดังรูปที่ 18 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 มีค่า O.D. ที่เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าอื่น ๆ ในช่วง 72 ชั่วโมงแรกแล้วจึงค่อย ๆ ลดลง และที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 ค่า O.D. เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 44 และมีแนวโน้มที่ลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 64 ส่วนที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1 ค่า O.D. เพิ่มขึ้นช้าที่

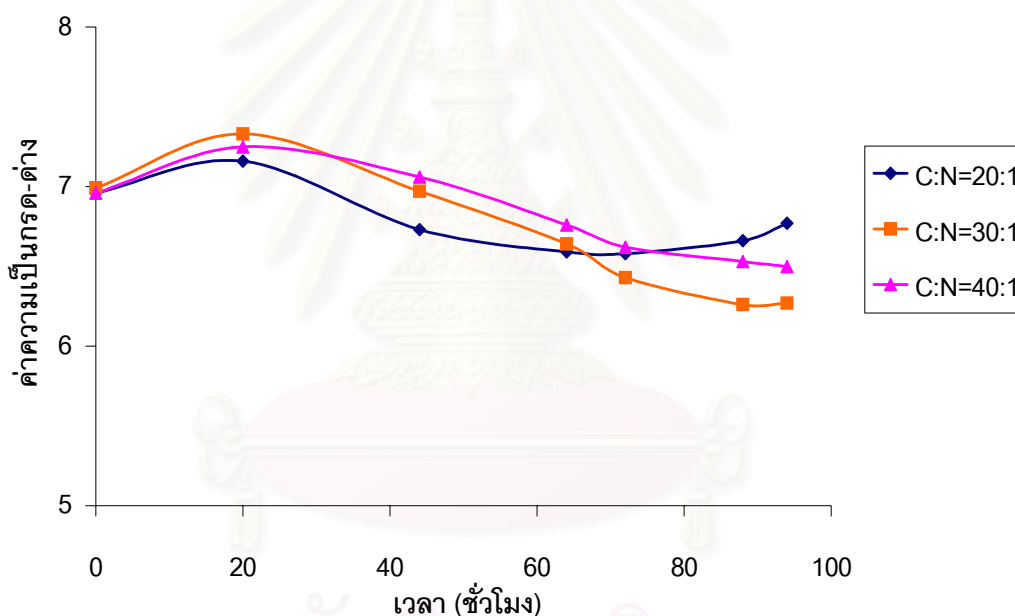
สุดเมื่อเทียบกับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าอื่น ๆ ในช่วงแรก จนถึงชั่วโมงที่ 64 ซึ่งที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 ค่า O.D. เริ่มคงที่และลดลงเล็กน้อยเมื่อสิ้นสุดการหมักและในขณะที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 เริ่มลดลง ค่า O.D. ของที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1 ยังมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีค่าใกล้เคียงกับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1



**รูปที่ 18** ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่า O.D. ของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C:N เท่ากับ 20:1 30:1 และ 40:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 94 ชั่วโมง

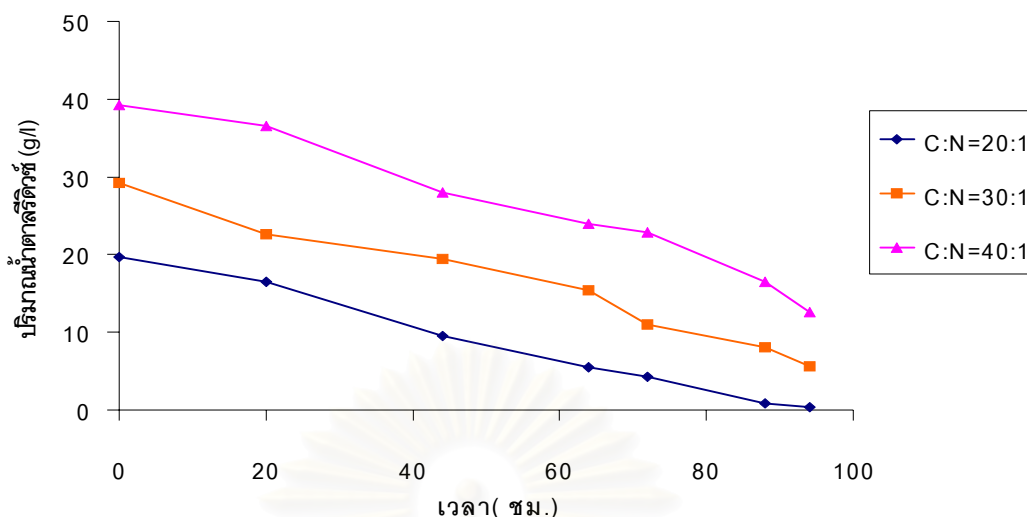
เมื่อติดตามค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักมีค่าลดลงแต่ไม่มากนักเมื่อเทียบกับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นดังรูปที่ 19 ซึ่ง Moraine และ Rogovin (1971) กล่าวว่าในการหมักแบบเขย่าการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างไม่สามารถควบคุมได้ซึ่งส่งผลให้ได้แทนแทนที่มีปริมาณน้อย จากการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของน้ำหมักอยู่ที่ 7 เมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 20:1 30:1 และ 40:1 มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.77 6.27 และ 6.50 ตามลำดับ ซึ่งที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 มีค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลงต่ำที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักเชื้อสามารถสร้างกรดอินทรีย์ทำให้

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลด โดยกรดอินทรีย์หรือสารประเภทกรดที่เซลล์สร้างขึ้นนั้นได้แก่ กรดกลูโคโรนิก อะซิติก และไฟรูวิก ซึ่งเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของแซนแทนกัมนั่นเอง ถ้า ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงต่ำกว่าจุดวิกฤตคือประมาณ 5.0 เชื้อจะสร้าง แซนแทนได้น้อยลง (Pettitt, 1978) แสดงให้เห็นว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 น่าจะมีการผลิตแซนแทนได้มากที่สุดทำให้เชื้อสามารถสร้างกรดอินทรีย์ออกมาระหว่าง กระบวนการผลิตเป็นผลให้น้ำหมักมีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงมากกว่าที่อัตราส่วนอื่น ๆ ซึ่งค่า ความเป็นกรด-ด่างจากการทดลองที่ได้ยังอยู่ในช่วงที่สอดคล้องกับการทดลองของ Whistler และ Bemiller (1973) ที่กล่าวว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการสร้าง polysaccharide ควรอยู่ใน ช่วง 6.0-7.5 เพราะการที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดต่ำมากจะมีผลไปยังการผลิต แซนแทนของเชื้อได้



**รูปที่ 19** ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักที่เปลี่ยนแปลงเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C:N เท่ากับ 20:1 30:1 และ 40:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 94 ชั่วโมง

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำหมักลดลงเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาการหมัก ดังรูปที่ 20 แสดงว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ได้และยังสามารถนำไปใช้ในการสร้างแซนแทนกัมได้อีกด้วย



**รูปที่ 20** ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำหมักเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C:N เท่ากับ 20:1 30:1 และ 40:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 94 ชั่วโมง

เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไปในแต่ละสูตรอาหาร พบว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 30:1 และ 40:1 มีเปอร์เซ็นต์การใช้น้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ เรียงจากมากไปน้อยตามลำดับดังนี้ 98.02 80.56 และ 67.84 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 13

**ตารางที่ 13** % น้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไปเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 30:1 และ 40:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 94 ชั่วโมง

| อัตราส่วน C:N | % น้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป  |
|---------------|--------------------------|
| 20:1          | 98.02 <sup>a</sup> ±1.52 |
| 30:1          | 80.56 <sup>b</sup> +9.37 |
| 40:1          | 67.84 <sup>c</sup> +5.74 |

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



ซึ่งจะเห็นว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 และ 30:1 มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1 ซึ่งที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1 นี้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในน้ำหมักมากที่สุด ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองปริมาณคาร์บอนที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเปล่าประโยชน์เมื่อเทียบกับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอื่น ๆ ซึ่งปริมาณน้ำตาลที่ระดับนี้อาจมากเกินไปจนความจำเป็นแต่ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 นั้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็ถูกใช้ไปจนเกือบหมดอาจเนื่องมาจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่น้อยที่สุดและถ้าหากว่ากระบวนการหมักยังไม่สิ้นสุดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้างแทนแทนกัมของเชื้ออาจจะไม่เพียงพอก็เป็นได้ ดังนั้นที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 จึงน่าจะเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับในช่วงที่เชื้อมีการสร้างแทนแทนกัมที่สุดเพราะเชื้อสามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้ปริมาณที่ค่อนข้างสูงและเมื่อสิ้นสุดการหมักยังคงเหลือปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักไม่มากเกินไปเหมือนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40:1 และไม่น้อยจนเกินไปเหมือนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1 สอดคล้องกับ ศศิธร โชติศศิธร (2535) ที่ใช้กลูโคสเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งของคาร์บอนพบว่า เป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญ มีผลทำให้ความหนืด ปริมาณกัมและปริมาณกรดไขมันสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ซึ่งถ้าเพิ่มปริมาณน้ำตาลเป็น 4-5 เปอร์เซ็นต์จะมีผลทำให้ยับยั้งการเจริญและการสร้างแทนแทนบางส่วนได้เช่นกัน และ Rogovin และคณะ (1965) ได้รายงานถึงการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมงพบว่าน้ำตาลกลูโคสเพียง 50 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่ถูกเปลี่ยนเป็นแทนแทน แต่ถ้าใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงกว่านี้ก็ไม่มีผลทำให้การผลิตแทนแทนกัมสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากความหนืดที่เกิดขึ้นในสภาวะการหมัก

ในตอนเริ่มต้นการทดลองเพื่อศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแทนแทนกัมนั้นได้ใช้เชื้อที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่เจริญเต็มที่จากน้ำหมักที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.5.1 ที่เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาเลี้ยงต่อในอาหารสูตรที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 30:1 และ 40:1 ในปริมาณเริ่มต้นที่เท่า ๆ กัน แต่เมื่อทำการหมักจนครบ 94 ชั่วโมง ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1 มี % cell dry weight สูงที่สุดคือ 0.36 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างกับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 คือเท่ากับ 0.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 มี % cell dry weight น้อยที่สุดคือเท่ากับ 0.15 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างจากที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 และ 40:1 ดังแสดงในตารางที่ 14 ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงนี้เชื้อที่นำมาใช้เป็นเชื้อที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่พร้อมที่จะสร้างแทนแทนโดยเชื้อจะใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตแทนแทนและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ ซึ่งถ้ามีจำนวนเซลล์มากก็จะทำให้การผลิตแทนแทนสูงตามไปด้วย

การแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์จะลดลงในช่วงนี้แต่จากการทดลองพบว่า % cell dry weight มีค่าเพิ่มขึ้นจากในข้อ 4.5.1 แสดงว่ายังมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ไปพร้อม ๆ กับการสร้างแซนแทนกัน โดยที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 และ 40:1 เป็นอัตราส่วนที่สามารถทำให้เชื้อมีการเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1

ความหนืดของน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 94 ชั่วโมงพบว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 มีความหนืดของน้ำหมักสูงที่สุดเท่ากับ 132.725 เซนติพอยซ์และที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 น้ำหมักมีความหนืด 50.925 เซนติพอยซ์ซึ่งเป็นค่าที่น้อยที่สุดเมื่อสิ้นสุดการหมัก ส่วนที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1 มีความหนืดของน้ำหมักเท่ากับ 95.850 เซนติพอยซ์ ดังแสดงในตารางที่ 14 ซึ่งความหนืดของน้ำหมักที่ได้น่าจะมาจากปริมาณของแซนแทนที่เชื้อสร้างขึ้นและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์สู่น้ำหมัก ดังนั้นถ้าความหนืดของน้ำหมักมีค่ามากปริมาณแซนแทนที่เซลล์สร้างก็น่าจะมากตามไปด้วย จากผลการทดลองที่ได้ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 น่าจะมีปริมาณของแซนแทนมากที่สุด รองลงมาคือที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1 และ 20:1 ตามลำดับ

เมื่อสิ้นสุดการหมักทำการตกตะกอนน้ำหมักที่ได้ด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ปริมาตร 2 เท่าของน้ำหมักเนื่องจากแอลกอฮอล์สามารถตกตะกอนพวก polysaccharide ได้ พบว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 มี % crude xanthan ไม่แตกต่างทางสถิติกับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1 คือเท่ากับ 3.18 เปอร์เซ็นต์ และ 3.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 ให้ % สารที่ตกตะกอนได้น้อยที่สุดเท่ากับ 2.06 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 14

**ตารางที่ 14** % cell dry weight ความหนืดของน้ำหมัก และ % crude xanthan เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 30:1 และ 40:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เป็นเวลา 94 ชั่วโมง

| อัตราส่วน C:N | % cell dry weight       | ความหนืดของน้ำหมัก (cp)     | % crude xanthan         |
|---------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 20:1          | 0.15 <sup>a</sup> ±0.02 | 50.925 <sup>a</sup> ±2.074  | 2.06 <sup>a</sup> ±0.17 |
| 30:1          | 0.33 <sup>b</sup> ±0.04 | 132.725 <sup>b</sup> ±5.392 | 3.18 <sup>b</sup> ±0.05 |
| 40:1          | 0.36 <sup>b</sup> ±0.03 | 95.850 <sup>c</sup> ±3.575  | 3.34 <sup>b</sup> ±0.04 |

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

ซึ่ง % crude xanthan ที่ตกตะกอนออกมาของที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 และ 30:1 ให้ผลสอดคล้องกับค่าความหนืดที่ได้ แต่ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1 ซึ่งให้ % crude xanthan สูงที่สุดแม้จะไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์กับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 แต่กลับมีความหนืดน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 ทั้งนี้ความหนืดอาจจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างของแซนแทนกัมด้วยว่ามีองค์ประกอบอย่างไร crude xanthan ที่ได้จากการหมักด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1 อาจจะทำให้ลักษณะทางโครงสร้างที่แตกต่างหรือด้อยกว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าอื่น ๆ จึงทำให้มีความหนืดแตกต่างจากที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนมากที่สุดเพราะให้ % crude xanthan ปริมาณสูงและมีความหนืดของน้ำหมักสูงที่สุดอีกด้วย

จากการทดลองหาปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 สามารถสรุปได้ว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 และ 30:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตแซนแทน ตามลำดับ โดย De Vuyst และคณะ (1987) กล่าวว่าระหว่างการหมักแบบขั้นตอนเดียวของ *X. campestris* นั้นมี 2 ระยะเวลาคือ trophophase เป็นระยะที่เซลล์เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนซึ่งมีความสัมพันธ์กับความต้องการปริมาณออกซิเจนที่สูงและในอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ต่ำ และระยะ idiophase เป็นระยะที่เริ่มมีการผลิตแซนแทนกัม ความต้องการออกซิเจนจะลดลงแต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง Zhao และคณะ (1991) รายงานว่าการหมักแบบขั้นตอนเดียวที่ใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส 24 กรัมต่อลิตรให้แซนแทนที่มีความเข้มข้นถึง 18 กรัมต่อลิตร ส่วน Amanullah และคณะ (1998) ใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 54 กรัมต่อลิตร ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Funahashi และคณะ (1987) ที่กล่าวถึงการหมักที่ไม่มีประสิทธิภาพเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นมากกว่า 50 กรัมต่อลิตร แต่ Rajeshwari และคณะ (1995) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแซนแทนคือ 50 กรัมต่อลิตร ส่วน Roseiro และคณะ (1993) ได้เสนอว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแซนแทนกัมนั้นควรมีสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 โดยสามารถผลิตแซนแทนกัมได้เท่ากับ 23 กรัมต่อลิตร แต่จากการทดลองเราใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 30:1 สำหรับการผลิตแซนแทนกัมพบว่าให้ปริมาณ crude xanthan เท่ากับ 31.8 กรัมต่อลิตรซึ่งมากกว่าที่ Roseiro ผลิตได้ Jana และ Ghosh (1995) ทำการทดลองผลิตแซนแทนกัมโดยใช้เชื้อ *X. campestris* S4L-11 ในระดับถึงหมักแล้วพบว่าการเพิ่มสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (โดยลดปริมาณไนโตรเจนลง) จาก 10 เป็น 25 ทำให้เชื้อมีการใช้

น้ำตาลรีดิวซ์ได้มากขึ้นและสามารถผลิตแซนแทนกัมได้มากขึ้น 50 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าแหล่งของคาร์บอนมีผลต่อต้นทุนในการผลิตแซนแทนกัมเพราะเชื้อสามารถนำไปใช้ในการสร้างแซนแทนกัมได้ ดังนั้นปริมาณคาร์บอนหรือน้ำตาลที่เพื่อนำไปใช้ในการสร้างแซนแทนที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้

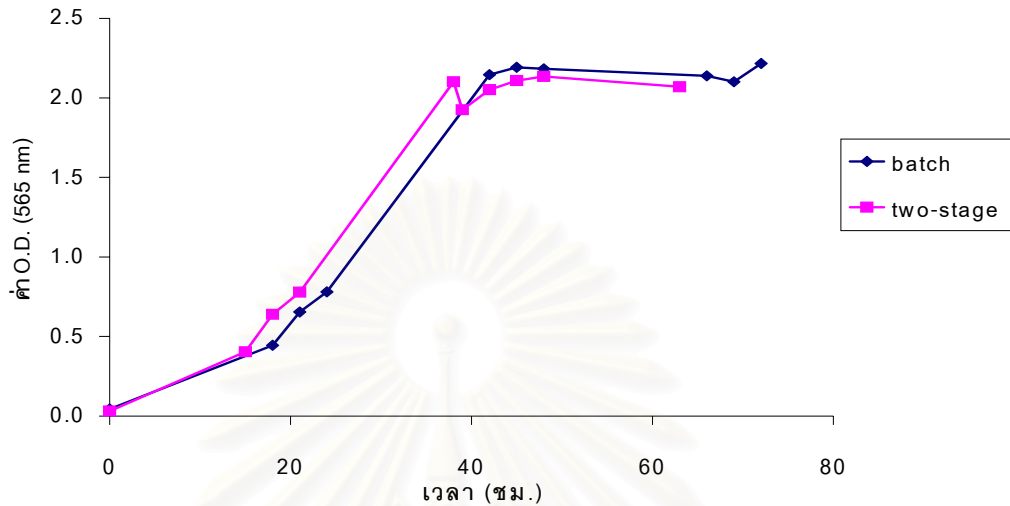
#### 4.4 ศึกษากระบวนการผลิตแซนแทนกัมโดยการหมักชนิดป้อนเป็นช่วงแบบ 2 ขั้นตอน (Two-Stage Fermentation)

จากการศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในการหมักแบบเขย่ามาแล้วนั้น นำผลที่ได้มาใช้ในการหมักชนิดป้อนเป็นช่วง (fed batch) แบบ 2 ขั้นตอน (two-stage) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าการทดลองหมักแซนแทนกัมแบบ 2 ขั้นตอนใช้เวลาในการหมักเพียง 63 ชั่วโมง ลดลงจากการหมักแบบขั้นตอนเดียวที่ใช้เวลา 72 ชั่วโมงลงถึง 9 ชั่วโมงเนื่องจากที่ชั่วโมงที่ 63 นี้ น้ำหมักมีความหนืดสูงมากจนกระทั่งไม่พบการถ่ายเทหรือเคลื่อนที่ของน้ำหมักภายในถังหมักเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า ปริมาณออกซิเจนที่สามารถละลายได้ก็มีค่าเท่ากับ 0 มิลลิกรัมต่อลิตรแล้ว และเมื่อทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผลต่าง ๆ ผลการวิเคราะห์ที่ได้ก็แทบจะไม่เปลี่ยนแปลงมากไปกว่านี้ การหมักแบบ 2 ขั้นตอนจึงช่วยลดเวลาและพลังงานในการผลิตลงได้มากกว่าการหมักแบบขั้นตอนเดียว

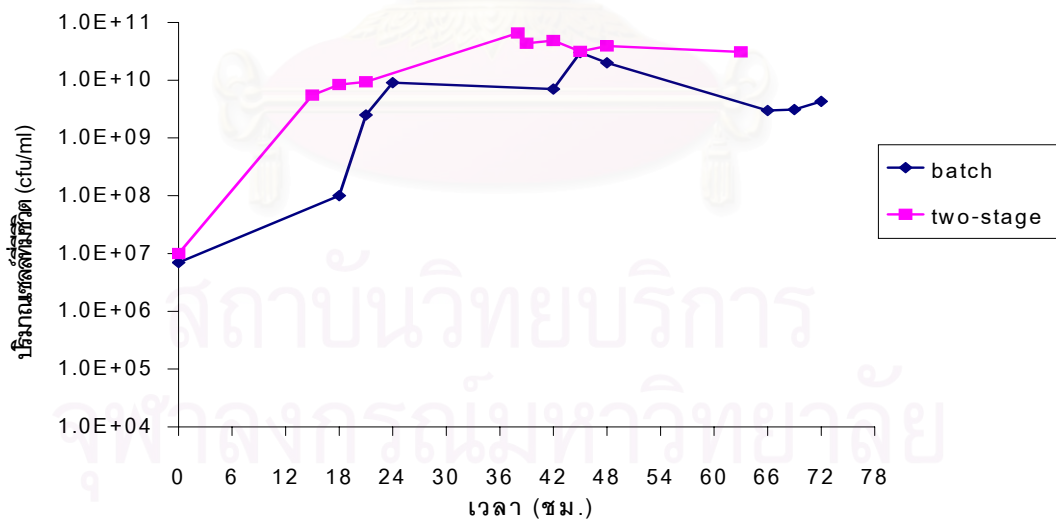
ค่า O.D. ของการหมักแบบ 2 ขั้นตอนก็เพิ่มขึ้นเร็วกว่าการหมักแบบขั้นตอนเดียวเมื่อเปรียบเทียบที่เวลาเดียวกันในช่วง 38 ชั่วโมงแรก เพราะเนื่องจากการหมักแบบ 2 ขั้นตอนใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 10:1 ซึ่งเป็นค่าเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อมากที่สุดที่ได้จากการทดลอง แต่การหมักแบบขั้นตอนเดียวใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 30:1 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่สูงไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อและอาจจะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อให้ลดลงได้อีกด้วยจึงทำให้ค่า O.D. เพิ่มขึ้นช้ากว่าการหมักแบบ 2 ขั้นตอน แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 39 การหมักแบบ 2 ขั้นตอนมีการปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนโดยการเติมแหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ลงไปและปรับปริมาตรเป็น 3 ลิตร ทำให้ค่า O.D. ลดลงหลังจากนั้นค่า O.D. ก็เพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 48 และ ค่อย ๆ ลดลงเช่นเดียวกับการหมักแบบขั้นตอนเดียว ดังรูปที่ 21

เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตพบว่าการหมักแบบ 2 ขั้นตอนมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 39 ชั่วโมงแรกที่ใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 ซึ่งเหมาะต่อการเจริญของเซลล์แตกต่างจากการหมักแบบขั้นตอนเดียวที่ปริมาณเซลล์มีชีวิตร้อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ และน้อยกว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่ได้จากการหมักแบบ 2 ขั้นตอน และ

หลังจากชั่วโมงที่ 39 การหมักแบบ 2 ขั้นตอนมีการปรับค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 30:1 พบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มคงที่ไม่มี的增加จำนวนอีก ส่วนการหมักแบบขั้นตอนเดียว ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 และลดลงอย่างรวดเร็ว ดังรูปที่ 22

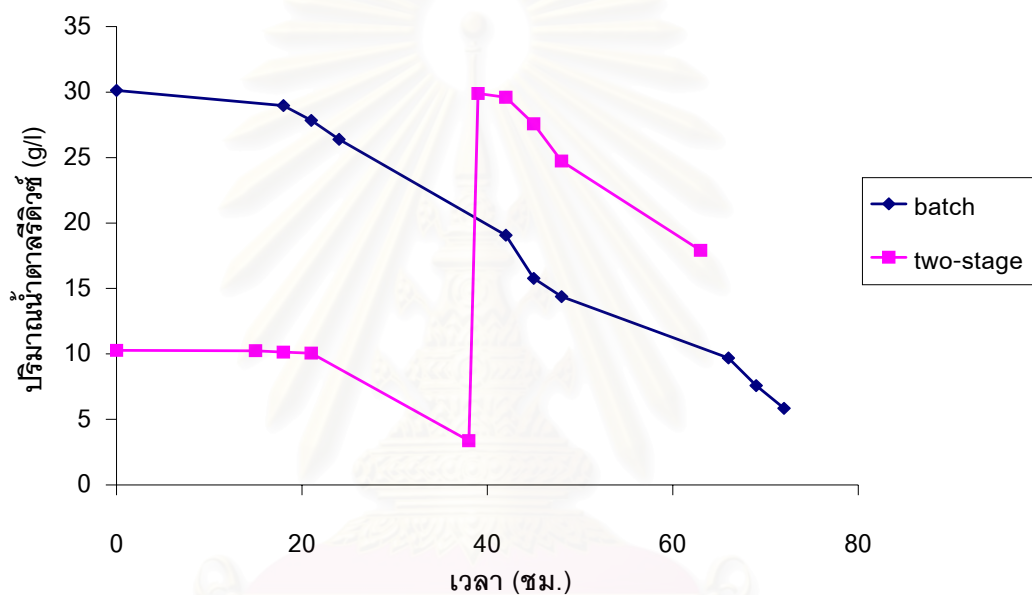


**รูปที่ 21** ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับค่า O.D. เมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียว (batch) และแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนให้อากาศ 0.5 vvm ใช้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศ 200 รอบต่อนาที (0-24 ชม.) 600 รอบต่อนาที (24-48 ชม.) และ 700 รอบต่อนาที (48-72 ชม.)



**รูปที่ 22** ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียว (batch) และแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนให้อากาศ 0.5 vvm ใช้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศ 200 รอบต่อนาที (0-24 ชม.) 600 รอบต่อนาที (24-48 ชม.) และ 700 รอบต่อนาที (48-72 ชม.)

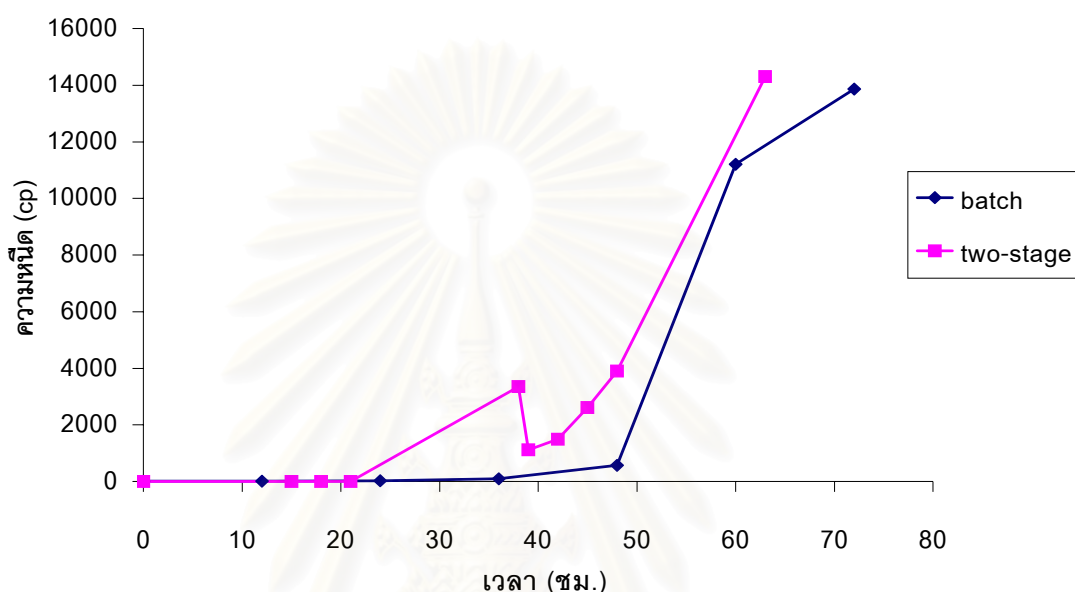
กราฟแสดงการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของการหมักแบบขั้นตอนเดียวและแบบ 2 ขั้นตอนจะแตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 23 โดยการหมักแบบขั้นตอนเดียวกราฟจะค่อย ๆ ลดลงเรื่อย ๆ เพราะน้ำตาลรีดิวซ์มีการถูกนำไปใช้อย่างต่อเนื่องในการผลิตแทนแกมแต่การหมักแบบ 2 ขั้นตอนจะมีการเติมน้ำตาลรีดิวซ์ลงไปเป็น 2 ช่วงตามอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เลือกใช้โดยเริ่มต้นใช้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร และถูกใช้ไปเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 38 เหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 3.38 กรัมต่อลิตร จึงทำการเติมน้ำตาลรีดิวซ์ลงไปให้มีความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร กราฟก็จะมีลักษณะพุ่งสูงขึ้นจนเมื่อสิ้นสุดการหมักเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 17.9 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 63



**รูปที่ 23** ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักเมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียว (batch) และแบบ 2 ขั้นตอน (two-stage) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการการให้อากาศ 0.5 vvm ใช้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศ 200 รอบต่อนาที (0-24 ชม.) 600 รอบต่อนาที (24-48 ชม.) และ 700 รอบต่อนาที (48-72 ชม.)

ความหนืดของน้ำหมักที่ทำการหมักแบบ 2 ขั้นตอนมีความหนืดมากกว่าการหมักแบบขั้นตอนเดียวโดยน้ำหมักเริ่มมีความหนืดเพิ่มขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 21 อย่างเห็นได้ชัด จนชั่วโมงที่ 38 น้ำหมักมีความหนืด 3,354 เซนติพอยซ์และเมื่อปรับค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 30:1 ค่าความหนืดของน้ำหมักมีค่าลดลง เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำหมักทำให้เกิดการเจือจางหลังจากนั้นค่าความหนืดก็เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนเมื่อสิ้นสุดการหมักที่ชั่วโมงที่ 63 น้ำหมักมีความหนืด 14,300 เซนติพอยซ์ ส่วนการหมักแบบขั้นตอนเดียวหลังจากชั่วโมงที่ 21 ค่าความหนืด

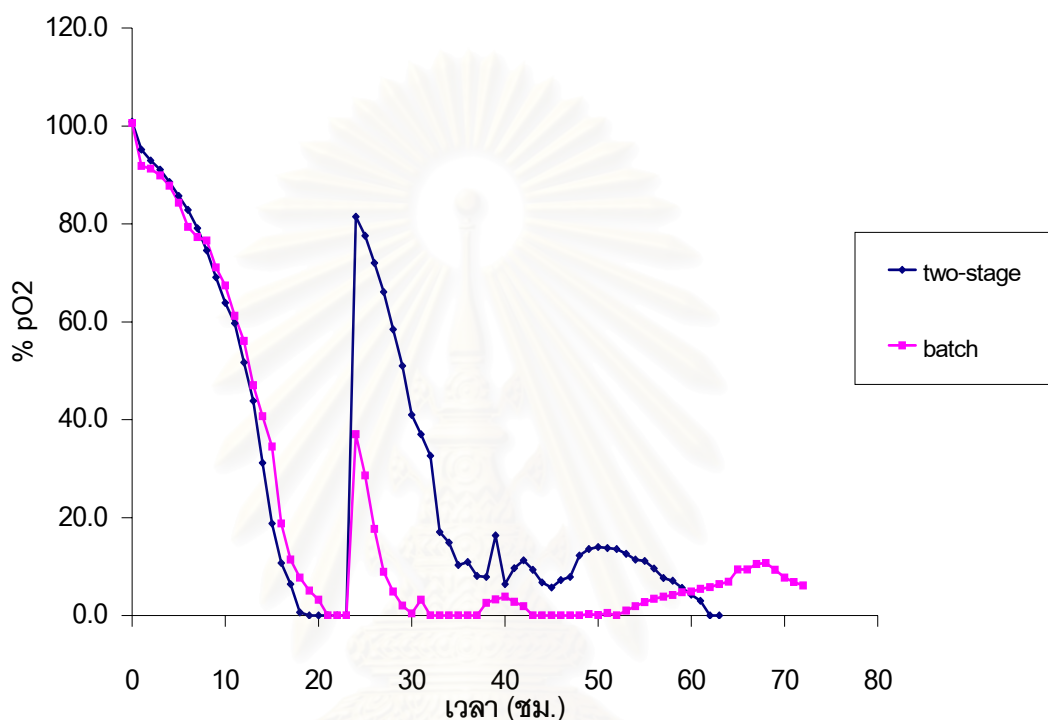
ของน้ำหมักมีค่าต่ำกว่าการหมักแบบ 2 ขั้นตอนจนกระทั่งสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมงน้ำหมักมีความหนืดเท่ากับ 13,860 เซนติพอยซ์ แสดงดังรูปที่ 24 ที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการผลิตแชนแทนกัมของการหมักแบบ 2 ขั้นตอนที่มีการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนได้อย่างเหมาะสม รวมทั้งมีการให้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศของไบปัดเป็นช่วง ๆ ที่เหมาะสมกับความหนืดของน้ำหมักที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ



**รูปที่ 24** ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความหนืดเมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียว (batch) และแบบ 2 ขั้นตอน (two - stage) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนให้อากาศ 0.5 vvm ใช้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศ 200 รอบต่อนาที (0-24 ชม.) 600 รอบต่อนาที (24-48 ชม.) และ 700 รอบต่อนาที (48-72 ชม.)

ส่วนความสัมพันธ์ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหมักที่แสดงในรูปของ %  $pO_2$  เมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวและแบบ 2 ขั้นตอน จะเห็นว่าในช่วง 24 ชั่วโมงแรกที่มีอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของไบปัดเท่ากับ 200 รอบต่อนาที การลดลงของ %  $pO_2$  มีค่าพอ ๆ กัน ไม่แตกต่างกันมากนักในทั้ง 2 แบบของวิธีการหมักโดย %  $pO_2$  ของการหมักแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนลดลงต่ำสุดที่ชั่วโมงที่ 21 และ 18 ตามลำดับ หลังจากนั้นมีการเพิ่มความเร็วยรอบในการกวนให้อากาศของไบปัดเป็น 600 รอบต่อนาที %  $pO_2$  ในการทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวเพิ่มขึ้นเป็น 37 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการหมักแบบ 2 ขั้นตอน %  $pO_2$  เพิ่มขึ้นถึง 87.4 เปอร์เซ็นต์ หลังจากชั่วโมงที่ 24 %  $pO_2$  ของทั้ง 2 วิธีการหมักเริ่มลดลงเรื่อย ๆ สำหรับการหมักแบบขั้นตอนเดียว %  $pO_2$  มีค่าลดลงจนเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ที่ชั่วโมงที่ 32 และเริ่มมีค่าค่อนข้างคงที่ เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 มีการเพิ่มความเร็วยรอบในการกวนให้อากาศของไบปัดเป็น 700 รอบต่อนาทีแต่ %  $pO_2$  ของ

การหมักแบบขั้นตอนเดียวก็ไม่เพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 53 จึงมีการเพิ่มขึ้นของ % pO<sub>2</sub> ขึ้นทีละน้อย และเมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง % pO<sub>2</sub> มีค่า 6.1 เปอร์เซ็นต์ แต่การหมักแบบ 2 ขั้นตอน หลังจากชั่วโมงที่ 24 ไม่พบว่า % pO<sub>2</sub> มีค่าลดลงจนถึง 0 เปอร์เซ็นต์เลยและก่อนที่จะเพิ่มความเร็วยรอบในการกวนให้อากาศของใบพัดเป็น 700 รอบต่อนาทีที่ชั่วโมงที่ 48 พบว่า % pO<sub>2</sub> มีค่าเท่ากับ 12.3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นก็เพิ่มขึ้นเล็กน้อยก่อนลดลงเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 62 ดังรูปที่



25

**รูปที่ 25** ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ (DO) เมื่อทำการหมักแบบขั้นตอนเดียว (batch) และแบบ 2 ขั้นตอน (two - stage) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนให้อากาศ 0.5 vvm ใช้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศ 200 รอบต่อนาที (0-24 ชม.) 600 รอบต่อนาที (24-48 ชม.) และ 700 รอบต่อนาที (48-72 ชม.)

เมื่อทำการตกตะกอนน้ำหมักด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอลปริมาตร 2 เท่าของน้ำหมักแล้ว นำ crude xanthan ที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ พบว่า % crude xanthan ของการหมักแบบ 2 ขั้นตอนมีค่าสูงถึง 3.50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การหมักแบบขั้นตอนเดียวให้ % crude xanthan เท่ากับ 2.23 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 15



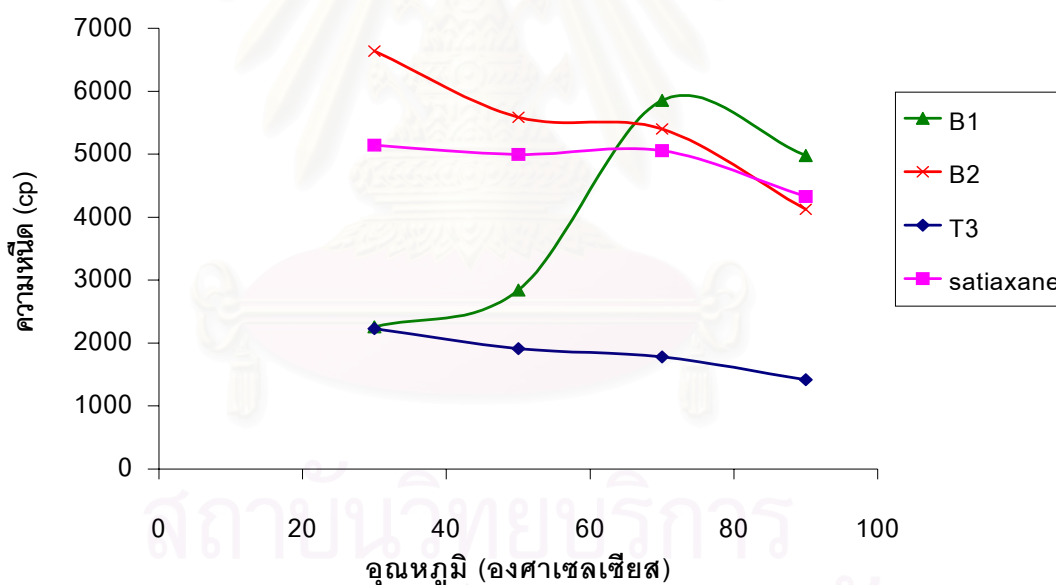
ตารางที่ 15 เปรียบเทียบ % crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบขั้นตอนเดียว และแบบ 2 ขั้นตอนโดยใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 3

| วิธีการหมัก               | % crude xanthan |
|---------------------------|-----------------|
| แบบขั้นตอนเดียว (batch)   | 2.23±0.22       |
| แบบ 2 ขั้นตอน (two-stage) | 3.50±0.56       |

จากการตรวจวัดค่าต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นเวลาที่ใช้ในการหมักที่น้อยกว่า ค่า O.D. ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ความหนืด ปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหมัก และ % crude xanthan พบว่าการหมักแบบ 2 ขั้นตอนให้ผลที่ดีกว่าการหมักแบบขั้นตอนเดียวทั้งสิ้น ยกเว้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่การหมักแบบ 2 ขั้นตอนมีปริมาณน้ำตาลเหลือมากกว่าการหมักแบบขั้นตอนเดียวถึง 12.06 กรัมต่อลิตร ถ้ามีการเพิ่มความเร็วยกในการกวนให้อากาศสูงกว่า 700 รอบต่อนาทีในช่วงท้ายของการหมัก อาจทำให้การหมักยังไม่สิ้นสุดลงแค่ที่ 63 ชั่วโมงก็เป็นได้ เพราะการกวนให้อากาศที่ความเร็วยกสูงกว่า 700 รอบต่อนาทีอาจจะทำให้น้ำหมักเกิดการเคลื่อนที่ได้ดีมีการถ่ายเทออกซิเจนได้ดีจนทำให้ออกซิเจนสามารถละลายได้เพิ่มขึ้นซึ่งอาจจะมีการใช้น้ำตาลในการสร้างแซนแทนได้มากขึ้นทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงมากกว่านี้ โดยปกติแล้วแซนแทนเป็น secondary metabolite คือจะเริ่มมีการสร้างแซนแทนในช่วงหลังจากที่เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนจนถึงปลาย log phase แล้วนั่นเอง ดังนั้นการหมักแบบ 2 ขั้นตอนจึงมีประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนมากกว่าแบบขั้นตอนเดียว แต่ทั้งนี้ต้องมีการควบคุมสภาวะและปัจจัยต่าง ๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแซนแทนกัมของเซลล์ด้วย จึงจะทำให้กระบวนการผลิตแซนแทนเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์มากขึ้น ในการทดลองของ Vuyst, Loo และ Vandemme (1987) ซึ่งแยกวิธีการผลิตแซนแทนกัม ออกเป็น 2 ขั้นตอน ในขั้นแรกกระตุ้นให้เกิดการเจริญของเชื้อมาก ๆ ก่อน ทำให้ผลผลิตแซนแทนกัมเพิ่มจาก 0.22 กรัมต่อกรัมเซลล์ เป็น 0.33 กรัมต่อกรัมเซลล์ แต่ธัญยาภรณ์ นาวินวรรณ (2542) กล่าวว่า การหมักแบบ 2 ขั้นตอนโดยมีการกระตุ้นให้เชื้อเจริญก่อนไม่ช่วยให้ประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมเพิ่มขึ้นเพียงแต่ใช้เวลาในการหมักน้อยลงเท่านั้นเอง

#### 4.5 วิเคราะห์คุณสมบัติของแซนแทนกัม

เมื่อนำ crude xanthan ที่ได้จากการหมักเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 แบบขั้นตอนเดียว (batch) ที่ใช้การกวนให้อากาศของไบพัดแบบที่ 1 และ 2 (B1 และ B2) รวมทั้ง crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบสองขั้นตอน (two-stage) ที่ใช้การกวนให้อากาศของไบพัดแบบที่ 3 (T3) มาวิเคราะห์คุณสมบัติในด้านต่าง ๆ โดยเตรียมเป็นสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ของ crude xanthan เปรียบเทียบกับสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ ของแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 เมื่อทำการแปรอุณหภูมิของสารละลายแซนแทนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็น 30 50 70 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่าทั้งสารละลาย crude xanthan (T3) และสารละลาย Satiaxane™ CX 91 มีความคงตัวของความหนืดค่อนข้างดี โดยให้ค่าความหนืดที่ไม่เปลี่ยนแปลงมากนักแต่สารละลาย crude xanthan (B1) พบว่าความหนืดมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มของอุณหภูมิแต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 90 องศาเซลเซียสความหนืดกลับมีค่าลดลง และสารละลาย crude xanthan (B2) ซึ่งให้ค่าความหนืดสูงที่สุดมีแนวโน้มในการลดลงเรื่อย ๆ ของความหนืดเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ ดังแสดงในรูปที่ 26



รูปที่ 26 ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองและสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

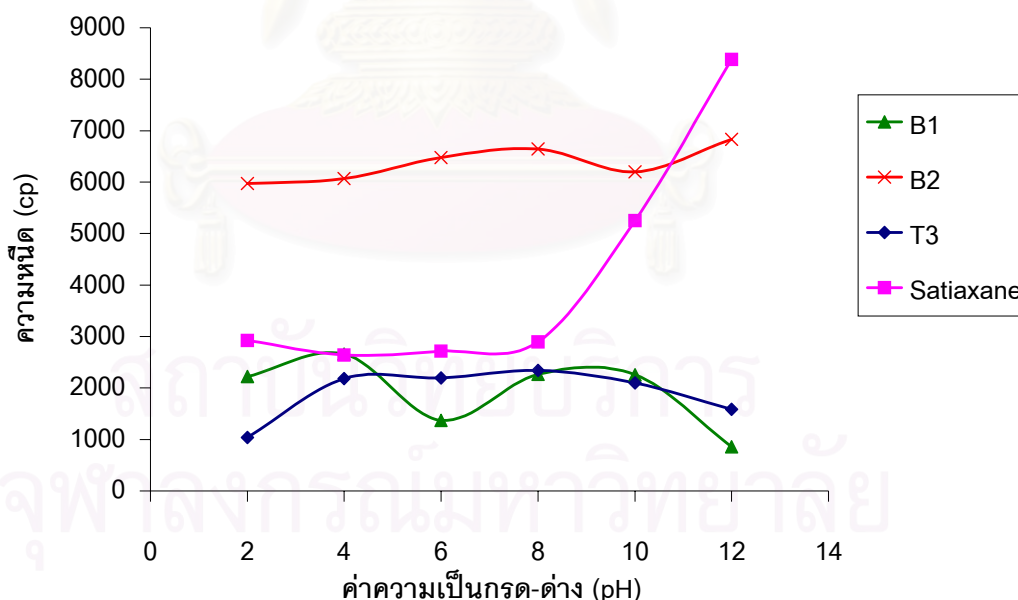
B1 คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ batch โดยใช้การกวนให้อากาศ 400 rpm (0-72 ชม.)

B2 คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ batch โดยใช้การกวนให้อากาศ 300 rpm (0-24 ชม.) 500 rpm (24-72 ชม.)

T3 คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ two-stage โดยใช้การกวนให้อากาศ 200 rpm (0-24 ชม.) 600 rpm (24-48 ชม.) 700 rpm (48-72 ชม.)

Satiaxane คือ แซนแทนกัมเกรดอาหาร

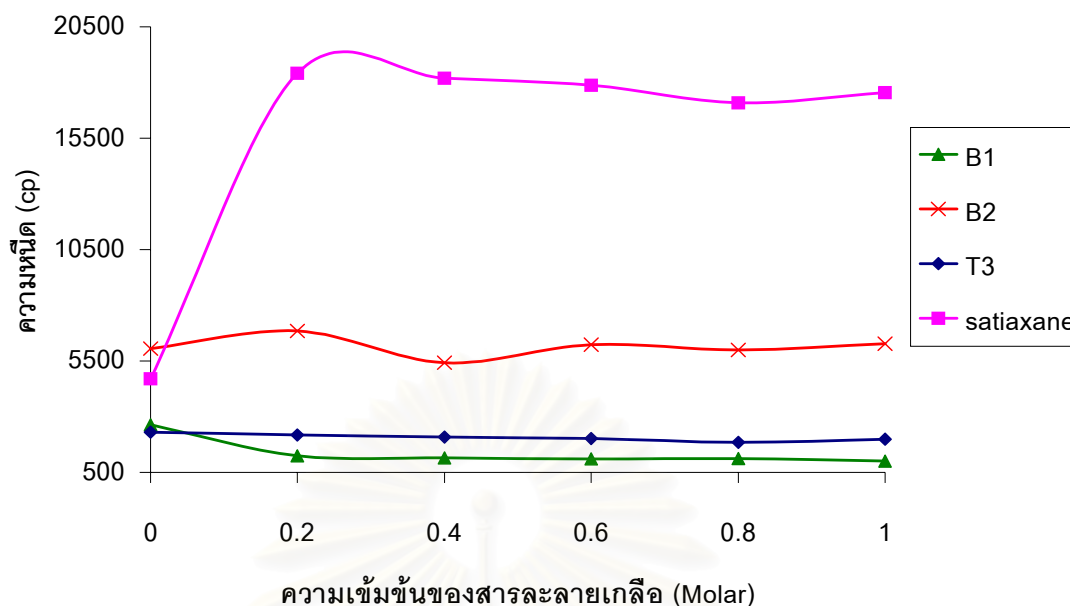
ดังนั้นแซนแทนที่มีคุณภาพดีในระดับเกรดอาหารจึงสามารถใช้กับอุตสาหกรรมอาหารที่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้เป็นอย่างดี จากการทดลองพบว่า crude xanthan (T3) น่าจะมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับแซนแทนกัมเกรดอาหารมากที่สุดแต่ความยาวของสายโพลีเมอร์อาจจะสั้นกว่าจึงทำให้ความหนืดที่ได้มีค่าต่ำกว่าแต่ความคงตัวค่อนข้างดี Batz (1979) กล่าวว่า สารละลายแซนแทนนั้นมีความสามารถที่จะรักษาความหนืดได้ในช่วงกว้าง เขาได้ทดลองเพิ่มอุณหภูมิในช่วง 0-95 องศาเซลเซียส ให้แก่สารละลายแซนแทน 1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเกลือโซเดียม-คลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความหนืด 1,000 เซนติพอยซ์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าความหนืดเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 100 เซนติพอยซ์ เมื่อเติมลงในอาหารจะทำให้อาหารมีความคงตัวสูง ไม่เกิดการแยกชั้น ไม่ถูกไฮโดรไลซ์ แม้อุณหภูมิในขณะที่เก็บรักษาหรือขณะแปรรูปจะเปลี่ยนแปลง ส่วนความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่มีการแปรค่าความเป็น กรด-ด่างเท่ากับ 2 4 6 8 10 และ 12 แสดงดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองและสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

- B1 คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ batch โดยใช้การกวนให้อากาศ 400 rpm (0-72 ชม.)
- B2 คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ batch โดยใช้การกวนให้อากาศ 300 rpm (0-24 ชม.) 500 rpm (24-72 ชม.)
- T3 คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ two-stage โดยใช้การกวนให้อากาศ 200 rpm (0-24 ชม.) 600 rpm (24-48 ชม.) 700 rpm (48-72 ชม.)
- Satiaxane คือ แซนแทนกัมเกรดอาหาร

จะเห็นว่าสารละลาย crude xanthan (B2) มีความคงตัวของความหนืดดีมากในทุก ๆ ค่าความเป็นกรด-ด่างโดยมีค่าความหนืดเปลี่ยนแปลงในช่วงแคบเมื่อเทียบกับสารละลาย crude xanthan ตัวอื่น ๆ และสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร อีกทั้งยังให้ความหนืดที่สูงที่สุดอีกด้วย สารละลาย crude xanthan (T3) ให้ความคงตัวของความหนืดค่อนข้างดีในช่วงความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 4 ถึง 10 และสารละลาย crude xanthan (B1) ก็มีการเปลี่ยนแปลงของความหนืดบ้างเล็กน้อยในแต่ละค่าความเป็นกรด-ด่างแต่ยังให้ค่าความหนืดที่ไม่คงที่นัก ส่วนสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 มีความคงตัวของความหนืดค่อนข้างดีในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 4-8 เท่านั้น แต่ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 10 และ 12 ให้ความหนืดที่มีค่าไม่คงที่ โดยที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 10 และ 12 พบว่าสารละลาย crude xanthan มีความหนืดลดลงจากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับช่วง 4 ถึง 8 แต่สารละลาย Satiaxane™ CX 91 กลับมีความหนืดเพิ่มสูงขึ้นจากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับช่วง 4 ถึง 8 ซึ่งที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2 10 และ 12 ในทางอุตสาหกรรมอาหารไม่ค่อยพบว่ามีอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงนี้ ดังนั้นที่ค่าความเป็นกรด-ด่างช่วง 4 ถึง 8 ซึ่งเป็นค่าที่พบบ่อยมากในอุตสาหกรรมอาหารแซนแทนกัมจึงสามารถใช้ได้เพราะให้ค่าความหนืดที่ค่อนข้างคงที่ สารละลายกัมหลายชนิดจะมีความหนืดเปลี่ยนแปลงไปตามค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่เปลี่ยนไปแต่ในสารละลายแซนแทนกัม จะเกิดการเปลี่ยนแปลงความหนืดน้อยมากเมื่อความเป็นกรดหรือด่างเปลี่ยนแปลง แซนแทนกัมสามารถใช้เป็นสารให้ความหนืดในสารละลายที่มีกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และในสารละลายที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์สูงถึง 5 เปอร์เซ็นต์ ได้โดยไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความหนืดแต่อย่างใด (Rocks, 1971) ส่วนความคงตัวของ ความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายเกลือที่มีการแปรความเข้มข้นของ สารละลายเกลือ เป็น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ แสดงดังรูปที่ 28 พบว่าเมื่อมีการเติมเกลือลงในสารละลาย Satiaxane™ CX 91 จะให้ความหนืดเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่มีการเติมเกลือ ส่วนในสารละลาย crude xanthan ทุกตัวค่าความหนืดมีความ



**รูปที่ 28** ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายเกลือต่อสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองและสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

**B1** คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ batch โดยใช้การกวนให้อากาศ 400 rpm (0-72 ชม.)

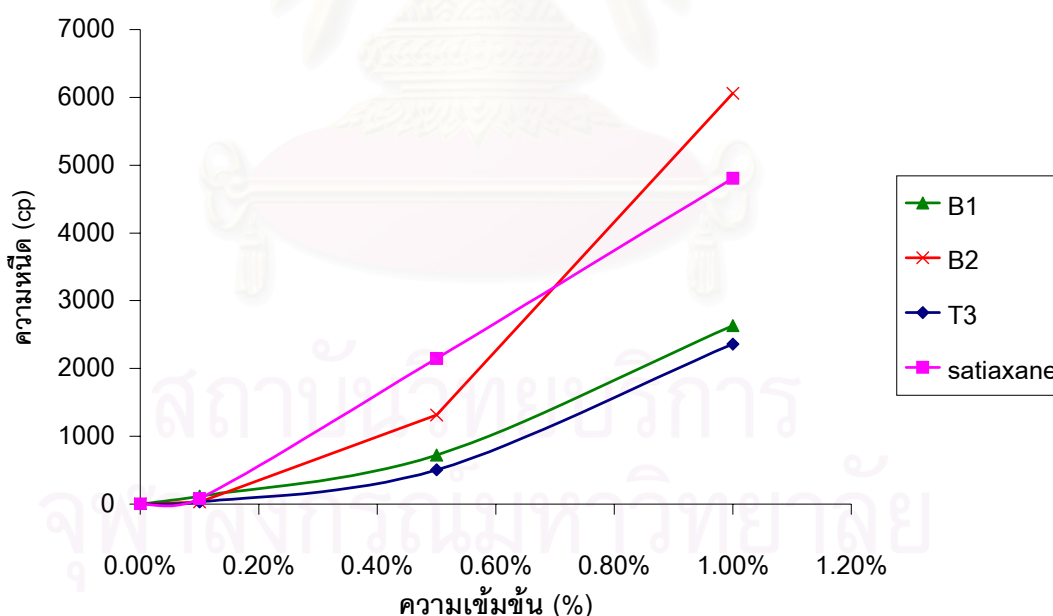
**B2** คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ batch โดยใช้การกวนให้อากาศ 300 rpm (0-24 ชม.) 500 rpm (24-72 ชม.)

**T3** คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ two-stage โดยใช้การกวนให้อากาศ 200 rpm (0-24 ชม.) 600 rpm (24-48 ชม.) 700 rpm (48-72 ชม.)

**Satiaxane** คือ แซนแทนกัมเกรดอาหาร

คงตัวมากและมีการเปลี่ยนแปลงของความหนืดน้อยมากทั้งในสภาวะที่มีการเติมเกลือและไม่เติมเกลือแต่ทั้งสารละลาย crude xanthan และสารละลาย Satiaxane™ CX 91 มีความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของสารละลายเกลือได้ดีมาก โดย Kennedy และ Bradshaw (1984) รายงานว่าความหนืดที่ลดลงมีผลเนื่องจากการเติมเกลือลงไป นอกจากนี้แซนแทนที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.2 เปอร์เซ็นต์ การเติมเกลือจะไปลดความหนืดลงเนื่องจากที่ low ionic strength (ไม่มีการเติมเกลือ) โครงสร้างของแซนแทนจะมีการแผ่กระจายสูง เมื่อมีการเติมเกลือลงไปจะทำให้โมเลกุลเกิดการรวมตัวเป็น random coil มากขึ้น อาจเกิดการรวมกันเป็นกลางตกตะกอนหรือเพิ่มขนาดโมเลกุลให้แน่นขึ้นความหนืดจึงลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างจะส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงของความหนืด Morris (1977); Shatwell และ Sutherland

(1990) รายงานว่าการเติมเกลือร่วมกับการทำ heat treatment (110 องศาเซลเซียส) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแซนแทนโดยโครงสร้างจะมีการขยายตัวมากขึ้นซึ่งทำให้ความหนืดเพิ่มสูงขึ้น สารละลายที่มีแซนแทนมากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ การเติมเกลือลงไปเล็กน้อยจะช่วยเพิ่มความหนืดได้ อาหารส่วนมากมีปริมาณเกลือมากพออยู่แล้วการเติมแซนแทนในอาหารประเภทเข้มข้น เช่น ซอส น้ำสลัด หรืออาหารกระป๋อง ที่ต้องให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำเป็นเวลานานจึงสามารถป้องกันอาหารจากการสูญเสียคุณสมบัติไปได้ (ศศิธร โชติศศิธร, 2535) และเมื่อทำการวัดความหนืดของสารละลาย crude xanthan (B1, B2 และ T3) และสารละลาย Satiaxane™ CX 91 ที่ความเข้มข้นของกัมค่าต่าง ๆ ดังนี้ 0.1 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย crude xanthan (B1, B2 และ T3) และสารละลาย Satiaxane™ CX 91 ให้ความหนืดเท่ากับ 116.73 30.73 30.73 และ 79.87 เซนติพอยซ์ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย crude xanthan (B1, B2 และ T3) และสารละลาย Satiaxane™ CX 91 ให้ความหนืดเท่ากับ 725.17 1314.33 503.80 และ 2,150.33 เซนติพอยซ์ ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย crude xanthan (B1, B2 และ T3) และสารละลาย Satiaxane™ CX 91 ให้ความหนืดเท่ากับ 2,635.33 6,057.67 2,359 และ 4,804 เซนติพอยซ์ ตามลำดับ ดังรูปที่ 29



**รูปที่ 29** ความหนืดของสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองและสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ที่ความเข้มข้นค่าต่าง ๆ

**B1** คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ batch โดยใช้การกวนให้อากาศ 400 rpm (0-72 ชม.)

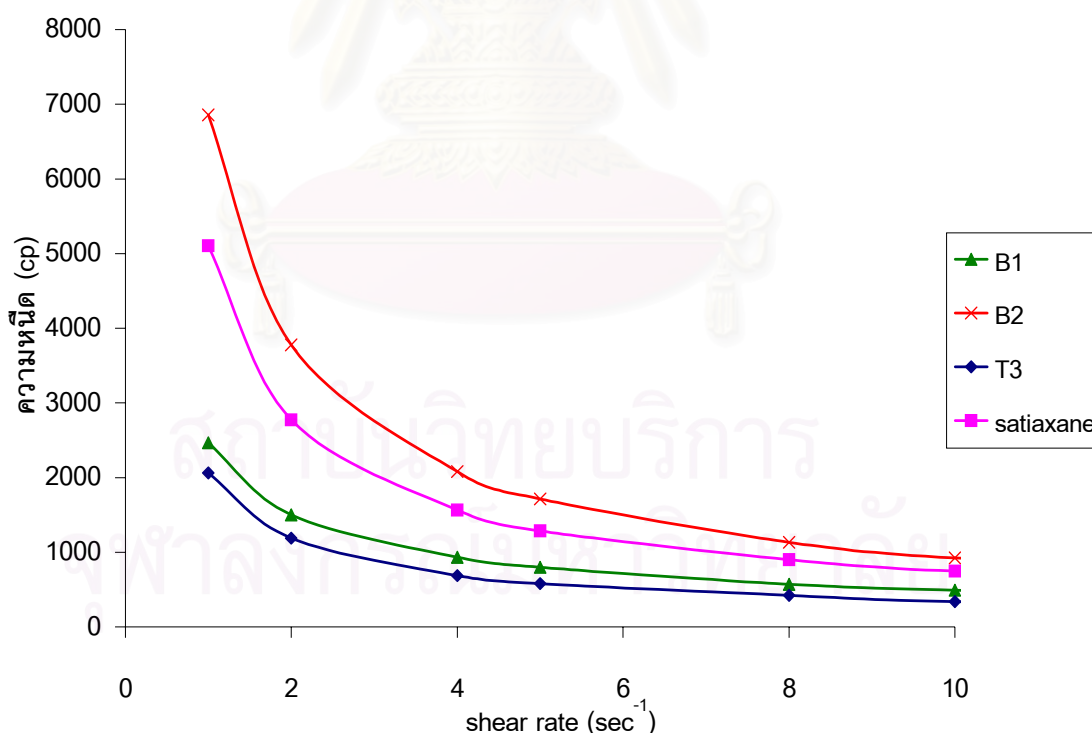
B2 คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ batch โดยใช้การกวนให้อากาศ 300 rpm (0-24 ชม.) 500 rpm (24-72 ชม.)

T3 คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ two-stage โดยใช้การกวนให้อากาศ 200 rpm (0-24 ชม.) 600 rpm (24-48 ชม.) 700 rpm (48-72 ชม.)

Satiaxane คือ แชนแทนกัมเกรดอาหาร

แต่ crude xanthan ที่ได้จากการทดลองทุกตัวสามารถละลายน้ำได้ง่ายกว่า Satiaxane™ CX 91 แต่ให้ความหนืดน้อยกว่า Satiaxane™ CX 91 ค่อนข้างมาก ยกเว้น crude xanthan (B2) ที่ให้ความหนืดที่สูงกว่าสารละลายแชนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ในบางสภาวะ

เมื่อศึกษาถึงค่าความหนืดที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการแปรค่า shear rate เป็น 1.0 2.0 4.0 5.0 8.0 และ 10.0 ( $\text{sec}^{-1}$ ) พบว่าทั้งสารละลาย crude xanthan ทุกตัวและสารละลายแชนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 มีความเป็น pseudoplastic เช่นเดียวกันดังแสดงในรูปที่ 30



รูปที่ 30 ความหนืดของสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองและสารละลายแชนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ที่ shear rate ค่าต่าง ๆ

- B1 คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ batch โดยใช้การกวนให้อากาศ 400 rpm (0-72 ชม.)
- B2 คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ batch โดยใช้การกวนให้อากาศ 300 rpm (0-24 ชม.) 500 rpm (24-72 ชม.)
- T3 คือ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ two-stage โดยใช้การกวนให้อากาศ 200 rpm (0-24 ชม.) 600 rpm (24-48 ชม.) 700 rpm (48-72 ชม.)
- Satiaxane คือ แซนแทนกัมเกรดอาหาร

เมื่อเพิ่มแรงกระทำหรือ shear rate ต่อสารละลาย crude xanthan (B1 B2 และ T3) หรือ สารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหารความหนืดของสารละลายจะมีค่าลดลง สอดคล้องกับ Betz (1979) ที่กล่าวว่าสารละลายแซนแทนกัมเป็นของไหลประเภท Non-Newtonian fluid ที่มีสมบัติเป็น pseudoplastic สูง คือ ถ้ามีแรงกระทำต่อสารละลายกัมน้อย ๆ (shear rate ต่ำ) สารละลายกัมจะมีความต้านทานสูง แต่เมื่อเพิ่มแรงกระทำขึ้น (shear rate สูง) ความหนืดก็จะลดลงอย่างรวดเร็วทำให้ไหลได้ง่ายขึ้น ระดับความเป็น pseudoplastic ของแซนแทนกัมจะสูงขึ้นด้วยการเพิ่มความเข้มข้น ซึ่งคุณสมบัตินี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีความเข้มข้นสูงขึ้น คุณสมบัติเช่นนี้จะช่วยป้องกันการตกตะกอนของสารขนาดใหญ่ ป้องกันหยดน้ำมันไม่ให้ลอยขึ้นบนผิวหน้าและยังช่วยในการบีบทำให้สะดวกในการบรรจุ (Anonymous, 1974)

#### 4.6 วิเคราะห์องค์ประกอบของแซนแทนกัม

เมื่อนำ crude xanthan ที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Roseiro สูตรปรับปรุง (ธัญยาภรณ์ นาวินวรณ, 2542) ที่ใช้ไฮโดรไลเซทจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนโดยทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 1 และ 2 (B1 และ B2) และ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ 2 ขั้นตอน ใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 3 (T3) รวมทั้งแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณของ total carbohydrate โดยวิธี phenol-sulphuric reagent ปริมาณ total protein โดยวิธี Lowry method ปริมาณ total nitrogen วิเคราะห์โดยวิธี Micro Kjeldahl Analysis และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเตรียมเป็นสารละลายแซนแทนกัมความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปทำการวิเคราะห์ รวมทั้งหา % ความชื้น (โดยน้ำหนักแห้ง) พบว่าให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 16



**ตารางที่ 16** แสดงองค์ประกอบต่าง ๆ ของสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองและสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร (Satiaxane™ CX 91) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

| Xanthan            | reducing sugar (g/l) | total carbohydrate (g/l) | total protein (mg/ml) | % total nitrogen | % moisture (dry weight) |
|--------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------|------------------|-------------------------|
| crude xanthan (B1) | 1.45                 | 5.46                     | 0.498                 | 0.010            | 14.2                    |
| crude xanthan (B2) | 1.82                 | 6.81                     | 0.349                 | 0.004            | 14.1                    |
| crude xanthan (T3) | 3.30                 | 7.23                     | 0.232                 | >0.002           | 15.0                    |
| Satiaxane™ CX 91   | 0.07                 | 6.85                     | 0.429                 | 0.100            | 14.3                    |

จากตารางที่ 16 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารละลาย crude xanthan (B1 B2 และ T3) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ที่ได้จากการทดลองมีค่ามากกว่าปริมาณน้ำตาลของสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณ total carbohydrate มีค่าใกล้เคียงกับสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำหมักที่นำมาตกตะกอนแซนแทนกัมด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ยังคงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเหลืออยู่ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการหมักด้วย ซึ่งสารละลาย crude xanthan (T3) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดเพราะเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักพบว่าการหมักด้วยวิธีนี้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงที่สุด ดังนั้นเมื่อนำมาตกตะกอนจึงทำให้น้ำตาลที่เหลือสามารถตกตะกอนลงมาด้วยเพราะไนไฮโดรไลเซสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์นี้มีน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ตัวอื่น ๆ ที่ไม่ใช่น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว รวมอยู่ด้วยซึ่งสารโอลิโกแซคคาไรด์นี้สามารถถูกตกตะกอนได้ด้วยเอธานอลเช่นเดียวกับแซนแทนกัม (Gonzales et al., 1989) เมื่อนำไปอบแห้งแล้วนำมาทำการวัดหาปริมาณ total carbohydrate และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จึงทำให้มีค่าสูงกว่าที่วิเคราะห์ได้จากสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ส่วนปริมาณ total protein ของสารละลาย crude xanthan (B1 B2 และ T3) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าใกล้เคียงกับสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ % total nitrogen พบว่ามีค่าน้อยกว่าสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณโปรตีนและปริมาณไนโตรเจนอาจมีผลต่อความหนืดทำให้อาหารละลาย crude xanthan ที่ได้จาก

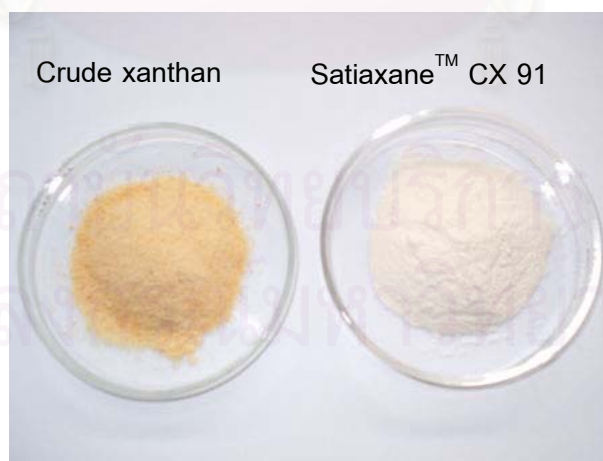
การทดลองมีความหนืดที่ต่ำกว่าแซนแทนกัมเกรดอาหารค่อนข้างมาก crude xanthan ที่ได้จากการทดลองยังมีความบริสุทธิ์น้อยกว่าแซนแทนกัมเกรดอาหารมากเพราะยังไม่ได้ผ่านการปั่นแยกเอาเซลล์ออกก่อนที่จะนำมาตกตะกอนแซนแทนเนื่องจากน้ำหมักมีความหนืดสูงมาก ดังรูปที่ 31



รูปที่ 31 ลักษณะของน้ำหมักแซนแทนที่ได้เมื่อสิ้นสุดการหมัก

(1) ยังไม่ผ่านการทำ heat treatment (2) ผ่านการทำ heat treatment แล้ว

ถ้าจะปั่นเอาเซลล์ออกต้องทำการเจือจางในอัตราส่วนที่สูงซึ่งเครื่องมือที่มีอยู่ไม่เอื้ออำนวยต่อการปฏิบัติดังนั้นเซลล์บางส่วนจึงอาจจะตกตะกอนลงมาพร้อมกับ crude xanthan เนื่องจากแอลกอฮอล์สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ด้วยทำให้ crude xanthan ที่ผ่านการอบแห้งแล้วมีลักษณะเป็นสีเหลืองเข้มมากกว่าแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ดังรูปที่ 32 เพราะลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อจะให้ลักษณะโคโลนีที่มีสีเหลืองเช่นกัน



รูปที่ 32 ลักษณะของ crude xanthan ที่ผ่านการอบแห้งแล้ว (รูปซ้าย) เปรียบเทียบกับแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 (รูปขวา)

อีกทั้งแซนแทนกัมเกรดอาหารอาจผ่านการทำให้บริสุทธิ์มากกว่าจึงทำให้สีที่ได้มีลักษณะขาวนวล แต่เมื่อสังเกตน้ำที่เหลือจากการแยกเอา crude xanthan ออกไปแล้วพบว่าน้ำที่แยกออกมาได้มีลักษณะใส สีเหลืองเข้ม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสีเหลืองเข้มของน้ำเกิดมาจากเซลล์ส่วนใหญ่ที่ตกตะกอนออกมาพร้อมกับแอลกอฮอล์จึงทำให้ปริมาณ total protein และ % total nitrogen ของสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองมีค่าใกล้เคียงกับแซนแทนกัมเกรดอาหาร นอกจากนี้ที่ความหนืดของสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองมีค่าน้อยกว่า สารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหารน่าจะเป็นเพราะอาจมีสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ ที่ร่วมตกตะกอนร่วมลงมาด้วย โดย Moreno และคณะ (1998) สิ่งปนเปื้อนส่วนใหญ่ที่พบในการผลิตแซนแทนคือพวก โพลีเมอร์ที่มีประจุ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก และน้ำที่มาจับกับโมเลกุลของแซนแทนเอง ต้องนำแซนแทนที่ได้ไปทำการวิเคราะห์จึงจะรู้ว่าสิ่งปนเปื้อนเหล่านี้ได้แก่อะไรบ้าง Sanchez และคณะ (1997) กล่าวว่าแซนแทนกัมที่มีปริมาณ total nitrogen สูงจะไม่เหมาะกับการนำไปใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารหรือเป็นส่วนผสมของเครื่องสำอาง

เมื่อทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยวิธี Gel Permeation Chromatography พบว่า crude xanthan (B1 B2 และ T3) และแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยดังแสดงในตารางที่ 17

**ตารางที่ 17** น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบขั้นตอนเดียวใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 1 และ 2 (B1 และ B2) crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ 2 ขั้นตอนใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 3 (T3) และแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91

| sample             | น้ำหนักโมเลกุล ( $\bar{M}_w$ ) | % Area |
|--------------------|--------------------------------|--------|
| Crude xanthan (B1) | $7.0 \times 10^6$              | 29.19  |
|                    | $1.8 \times 10^3$              | 39.57  |
|                    | $5.9 \times 10^2$              | 31.24  |
| Crude xanthan (B2) | $7.5 \times 10^6$              | 35.42  |
|                    | $1.2 \times 10^3$              | 64.58  |
| Crude xanthan (T3) | $9.4 \times 10^6$              | 21.00  |
|                    | $1.4 \times 10^3$              | 79.00  |
| Satiaxane™ CX 91   | $6.3 \times 10^6$              | 57.25  |
|                    | $7.8 \times 10^5$              | 17.65  |
|                    | $1.1 \times 10^3$              | 25.10  |

จากตารางที่ 17 พบว่า crude xanthan (B1 B2 และ T3) และแซนแทนกัมเกรดอาหาร นั้นมีสารที่เป็นองค์ประกอบซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่และเล็กรวมอยู่ด้วย 3 2 2 และ 3 ตัว ตามลำดับ และเมื่อพิจารณา % Area ร่วมกับ chromatogram ที่แสดงความสูงของ peak (ภาคผนวก ข 8) สำหรับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันแต่ละตัวจะพบว่า crude xanthan ที่ได้จากการทดลองจะมีปริมาณของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ ซึ่งแสดงถึงความยาวของสายโพลิเมอร์ของแซนแทนกัมที่มีความสามารถในการให้ความหนืดที่สูงอยู่ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ ทำให้ความหนืดของสารละลาย crude xanthan มีค่าน้อยกว่าสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหารที่มีสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่มากกว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กนั่นเอง แต่จากการวิเคราะห์พบว่า crude xanthan ที่ได้จากการทดลองมีสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ให้น้ำหนักโมเลกุลมีค่าใกล้เคียงกับแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 แต่ปริมาณของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ ที่ตรวจพบใน crude xanthan ที่ได้จากการทดลองมีปริมาณน้อยกว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในระหว่างกระบวนการหมัก crude xanthan ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักอาจจะไม่เพียงพอและไม่ทั่วถึงเนื่องจากความหนืดของน้ำหมักจนทำให้พบบริเวณที่ไม่มีการเคลื่อนที่ของน้ำหมักเลยซึ่งอาจทำให้เชื้อมีการสร้างแซนแทนได้อย่างไม่สมบูรณ์มีผลต่อการเชื่อมต่อกันของสายแซนแทนทำให้สายโซ่ที่เป็นโครงสร้างของแซนแทนมีขนาดสั้นยาวไม่เท่ากันและปริมาณสายสั้นอาจจะมีมากกว่าสายยาว รวมทั้งการใช้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศของใบพัดสูง ๆ ในช่วงหลังของการหมักที่น้ำหมักมีความหนืดสูง การหมุนของใบพัดอาจจะไปทำลายโครงสร้างโพลิเมอร์ของแซนแทนให้มีขนาดสั้นลงส่งผลถึงความหนืดของ crude xanthan ที่มีค่าต่ำกว่าแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ที่มีการการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม มีเครื่องมือที่ทันสมัยอยู่ค่อนข้างมาก และในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่สามารถละลายได้ทำให้พบว่าในบางช่วงของการหมักปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้มีค่าลดลงจนเป็นศูนย์โดยเครื่อง fermenter รุ่น Biostat® B ที่ใช้ในการทดลองแสดงดังรูปที่ 33



รูปที่ 33 เครื่อง fermenter รุ่น Biostat® B ขนาด 5 ลิตร ที่ใช้ในการทดลอง

Herbst และคณะ (1989) กล่าวว่า การหมักที่มีการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอและไม่มีบริเวณที่น้ำหมักมีการหยุดนิ่งในถังหมักแบบปิดจะทำให้ได้แซนแทนกัมปริมาณมากและมีน้ำหนักโมเลกุลสูง นอกจากนี้ Peter และคณะ (1989) ยังกล่าวว่าการใช้ความเร็วรอบในการกวนที่รอบสูง ๆ หรือมีปริมาณของออกซิเจนสูง ๆ จะให้ specific productivity พอ ๆ กัน ดูได้จากน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของแซนแทนที่พบว่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีการใช้ความเร็วรอบในการกวนที่สูงขึ้น และเมื่อมีการให้ออกซิเจนมากพอในขณะที่มีการกวนให้อากาศด้วยความเร็วรอบที่ต่ำก็ยังคงพบว่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของแซนแทนมีค่าเท่ากัน Asim และ Ghosh (1999) ทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวและแบบป้อนเป็นช่วง โดยใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ใช้ความเร็วรอบในการกวนให้อากาศเท่ากับ 600 รอบต่อนาทีพบว่าแซนแทนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ  $1.26 \times 10^6$  และ  $1.6 \times 10^6$  ตามลำดับ crude xanthan ที่ได้จากการทดลองให้ความหนืดที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นเดียวกันกับแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ซึ่งนอกจากปริมาณสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ และความยาวของสายแซนแทนที่อาจจะสั้นกว่าแล้ว ปริมาณของกรดไพรูวิกก็อาจมีผลต่อความหนืดได้เช่นกัน ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการเชื่อมต่อกันของสายโพลีเมอร์ของ แซนแทนอาจจะไม่สมบูรณ์นักเนื่องจากกิจกรรมการสร้างแซนแทนของเชื้อภายใต้สภาวะที่ขาดออกซิเจนในบางช่วงของการหมักทำให้ crude xanthan ที่ได้จากการทดลองอาจจะมีปริมาณของหมู่ไพรูวิกค่อนข้างน้อย ความหนืดที่ได้จึงค่อนข้างต่ำ ซึ่ง Kleinitz, Littmann และ Herbst (1989) กล่าวว่า แซนแทนที่มีปริมาณของไพรูเวตต่ำ ๆ ความหนืดน้อยเหมาะที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมขูดเจาะน้ำมันเนื่องจากจะเกิดการดูดซึมที่ผิวดินค่อนข้างน้อยทำให้การขูดเจาะดีขึ้น Shatwell และ Sutherland (1990) รายงานว่าความสัมพันธ์ของอะซิเตตต่อไพรูเวตจะมีความสัมพันธ์ที่เพิ่มขึ้นของ xanthan helix และการเพิ่มขึ้นของไพรูเวตจะทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้น (Callet, Milas and Rinaudo, 1987) ปริมาณกรดไพรูวิกในแซนแทนจะมีความแตกต่างกันเนื่องจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ เวลาในการหมัก สภาวะในการหมักและสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการหมัก (Asim and Ghosh, 1999) นอกจากนี้ Satiaxane™ CX 91 เป็นแซนแทนกัมเกรดอาหาร ที่ได้ผ่านกระบวนการผลิตโดยใช้กลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตและผ่านทำให้บริสุทธิ์มาแล้ว นอกจากนี้สายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ก็ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์และคัดเลือกมาเป็นอย่างดี Satiaxane™ CX 91 จึงมีความบริสุทธิ์และให้ความหนืดที่สูง รวมทั้งมีความคงตัวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ ได้ในช่วงกว้าง แต่จากการทดลองพบว่า crude xanthan ที่ได้จากการทดลองที่มีความบริสุทธิ์น้อยกว่าถึงแม้จะให้ความหนืดที่ต่ำกว่า Satiaxane™ CX 91 ที่ความเข้มข้นเดียวกันแต่ในเรื่องของความคงตัวของความหนืดที่สภาวะต่าง ๆ ก็สามารถให้ผลการทดสอบที่ดีกว่า Satiaxane™ CX 91 อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ซึ่งใช้ในงานวิจัยนี้สามารถผลิตแซนแทนกัมที่โครงสร้างเอื้อต่อการแสดงคุณสมบัติ

ทางกายภาพเช่นเดียวกับแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 โดยอาจจะมีปริมาณ  
หมู่อะซิติลมากกว่า (ฉันทยาภรณ์ นาวินวรณ, 2542) ซึ่ง Sutherland (1994) ได้รายงานว่าแซน  
แทนกัมที่มีหมู่อะซิติลมากจะสามารถทำให้คงตัวอยู่ในรูป order form ได้ดีจึงมีความคงตัวของ  
ความหนืดสูง



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

เมื่อทำการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ด้วยเอนไซม์ตามวิธีที่ดัดแปลงจากกัลลาณรงค์ ศรีรอดและคณะ (2540) พบว่าไฮโดรไลเซทที่ได้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้น 55 - 60 กรัมต่อลิตร มีค่า DE เท่ากับ 80 และเมื่อนำไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ไปผ่านการทำ Gel Permeation Chromatography พบว่าองค์ประกอบของไฮโดรไลเซทนอกจากน้ำตาลกลูโคสที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 182 แล้วยังมีน้ำตาลตัวอื่น ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 634 340 และ 249 รวมอยู่ด้วยทำให้ค่า DE ไม่เท่ากับ 100

เมื่อศึกษาผลของอัตราเร็วในการกวนให้อากาศของไบโพัตที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมโดยทำการหมักในถังหมักแบบขั้นตอนเดียว (batch fermentation) พบว่าความเร็วรอบในการกวนให้อากาศของไบโพัตที่เหมาะสมสำหรับการหมักแบบขั้นตอนเดียวคือที่ 200 รอบต่อนาที (0-24 ชั่วโมง) 600 รอบต่อนาที (24-48 ชั่วโมง) และ 700 รอบต่อนาที (48-72 ชั่วโมง) ซึ่งมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นในอัตราที่สูงกว่าที่การกวนให้อากาศแบบอื่น ๆ ส่งผลให้ได้ % crude xanthan สูงถึง 2.23 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความหนืดสุดท้ายเท่ากับ 13,860 เซนติพอยซ์ เนื่องจากมีปริมาณเซลล์ที่สามารถผลิตแซนแทนกัมได้มากกว่าทำให้การนำเอาแหล่งคาร์บอนไปใช้ในการผลิตแซนแทนกัมดีขึ้นเปอร์เซ็นต์การใช้น้ำตาลรีดิวซ์จึงสูงถึง 80.60 เปอร์เซ็นต์หมายถึงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในปริมาณน้อยมากเมื่อสิ้นสุดการหมักและ %  $pO_2$  เมื่อสิ้นสุดการหมักก็ยังมีเหลืออยู่ถึง 6.1 เปอร์เซ็นต์

เมื่อศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 โดยการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าพบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 มากที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ 48 ชั่วโมง เพราะให้ % cell dry weight และความหนืดของน้ำหมักเท่ากับ 0.129 เปอร์เซ็นต์ และ 19.68 เซนติพอยซ์ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15:1 นอกจากนี้ยังเป็นการประหยัดต้นทุนการผลิตลงเพราะสามารถใช้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่น้อยลงได้ด้วย และยังพบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมของเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 มากที่สุด เนื่องจากให้ % cell dry weight % crude xanthan และค่าความหนืดเท่ากับ 0.33 เปอร์เซ็นต์ 3.18 เปอร์เซ็นต์ และ 132.725 เซนติพอยซ์ ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำตาลรีดิทซ์ที่เป็นแหล่งคาร์บอนได้ถึง 80.56 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40:1 จะให้ผลการทดลองที่ดีกว่าแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนจึงเลือกที่อัตราส่วน 30:1 เนื่องจากว่าใช้ต้นทุนน้อยกว่าแต่ปริมาณและคุณภาพไม่แตกต่างกัน

เมื่อทำการหมักแบบ 2 ขั้นตอนเปรียบเทียบกับทำการหมักแบบขั้นตอนเดียวใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 3 เช่นเดียวกันในถังหมักขนาด 5 ลิตรพบว่าทำการหมักแบบ 2 ขั้นตอนใช้เวลาในการหมักเพียง 63 ชั่วโมงน้อยกว่าการหมักแบบขั้นตอนเดียวถึง 9 ชั่วโมงให้ % crude xanthan สูงเท่ากับ 3.50 เปอร์เซ็นต์ และให้ค่าความหนืดเท่ากับ 14,300 เซนติพอยซ์ ในขณะที่การหมักแบบขั้นตอนเดียวให้ % crude xanthan เท่ากับ 2.23 เปอร์เซ็นต์และให้ค่าความหนืด 13,860 เซนติพอยซ์

เมื่อศึกษาความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ 30 50 70 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่าทั้งสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ 2 ขั้นตอนใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 3 (T3) และสารละลาย Satiaxane™ CX 91 มีความคงตัวค่อนข้างดี ให้ความหนืดไม่เปลี่ยนแปลงมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบขั้นตอนเดียวใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 1 และ 2 (B1 และ B2) ที่มีความคงตัวต่ำกว่า ความคงตัวของความหนืดต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 4 6 8 10 และ 12 ของสารละลาย crude xanthan ทุกตัว (B1 B2 และ T3) ค่อนข้างดีคือมีความคงตัวในช่วงกว้าง ค่าความหนืดเปลี่ยนแปลงไม่มากนักแต่สารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 มีความคงตัวในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 ถึง 8 เท่านั้นแต่ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2 10 และ 12 ความหนืดของสารละลายแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 มีค่าความหนืดที่ไม่คงที่และแตกต่างจากความหนืดในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 ถึง 8 ค่อนข้างมากและเมื่อทำการแปรความเข้มข้นของสารละลายเกลือเป็น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ พบว่าความหนืดของสารละลาย Satiaxane™ CX 91 มีค่าเพิ่มขึ้นจากที่ไม่มีการเติมเกลือและมีความคงตัวของความหนืดที่ความเข้มข้นของสารละลายเกลือค่าต่าง ๆ เป็นอย่างดี ส่วน สารละลาย crude xanthan ที่ได้จากการทดลองทุกตัว (B1 B2 และ T3) มีความคงตัวของความหนืดค่อนข้างคงที่เช่นเดียวกับ Satiaxane™ CX 91 และให้ความหนืดไม่แตกต่างจากตอนที่ไม่มีเกลือลงไป เมื่อแปรความเข้มข้นของสารละลายกัมเป็น 0.1 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์พบว่าความหนืดมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นแต่ความหนืดของสารละลาย crude xanthan ทุกตัว (B1 B2 และ T3) มีค่าน้อยกว่าความหนืดของสารละลาย Satiaxane™ CX 91 ค่อนข้างมาก ยกเว้น crude xanthan (B2) ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ให้ความหนืดที่สูงกว่าสารละลาย แซนแทนกัมเกรดอาหาร และเมื่อทำการแปรค่า shear rate เป็น 1.0 2.0 4.0 5.0



8.0 และ 10.0 ( $\text{sec}^{-1}$ ) พบว่าทั้งสารละลาย crude xanthan (B1 B2 และ T3) และสารละลายแซนแทนแกมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 มีความหนืดลดลงเมื่อมีการเพิ่ม shear rate

เมื่อนำสารละลายความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ของ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบขั้นตอนเดียวใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 1 และ 2 (B1 และ B2) crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ 2 ขั้นตอนใช้การกวนให้อากาศแบบที่ (T3) และแซนแทนแกมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 ไปวิเคราะห์หาปริมาณของ total carbohydrate และปริมาณ total protein พบว่าสารละลาย crude xanthan ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์มีปริมาณ total carbohydrate และปริมาณ total protein ใกล้เคียงกับสารละลายแซนแทนแกมเกรดอาหารความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าสารละลายแซนแทนแกมเกรดอาหารความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แต่มี % total nitrogen น้อยกว่าสารละลายแซนแทนแกมเกรดอาหารความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดย crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบขั้นตอนเดียวใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 1 และ 2 (B1 และ B2) และ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ 2 ขั้นตอนใช้การกวนให้อากาศแบบที่ (T3) และแซนแทนแกมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 มี % ความชื้นเท่ากับ 14.2 14.1 15.0 และ 14.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยวิธี Gel Permeation Chromatography พบว่า crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบขั้นตอนเดียวใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 1 และ 2 (B1 และ B2) และ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ 2 ขั้นตอนใช้การกวนให้อากาศแบบที่ (T3) มีสารที่เป็นองค์ประกอบที่น้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับแซนแทนแกมเกรดอาหารแต่ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบขั้นตอนเดียวใช้การกวนให้อากาศแบบที่ 1 และ 2 (B1 และ B2) และ crude xanthan ที่ได้จากการหมักแบบ 2 ขั้นตอนใช้การกวนให้อากาศแบบที่ (T3) มีปริมาณของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ น้อยกว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ ค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับแซนแทนแกมเกรดอาหารที่มีสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ เป็นจำนวนมากกว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาถึงปริมาณไฟรูเวทของแซนแทนแกมที่ผลิตได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับแซนแทนแกมเกรดอาหาร รวมทั้งปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณไฟรูเวท
2. น่าจะมีกระบวนการที่ทำให้ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้นหรือทำการคัดแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำตาลกลูโคสมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์

3. ควรศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการให้อากาศและความเร็วรอบในการกวนให้อากาศของใบพัดที่มีผลต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหมัก
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแซนแทนที่สามารถให้ปริมาณแซนแทนกัมที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ เป็นจำนวนมาก



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- กล้าณรงค์ ศรีรอด. 2538. ความรู้เบื้องต้นในการผลิตกลูโคสซีรัปจากแป้งและกากมันสำปะหลัง. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กล้าณรงค์ ศรีรอด, บรรณานิติการ. 2544. แป้งไทยดีอย่างไร. ข่าวสารวิชาการในวงการแป้ง. 1, 1 (มกราคม-มีนาคม): 1-2.
- กล้าณรงค์ ศรีรอด, บรรณานิติการ. 2545. สารหน้ารู้เกี่ยวกับแป้ง. ข่าวสารวิชาการในวงการแป้ง. 2, 2 (เมษายน-มิถุนายน): 6-7.
- กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2543. เทคโนโลยีของแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กล้าณรงค์ ศรีรอด, รังสิมา ชลคุป, สุनीย์ โชตินีรนาท และ สิทธิโชค วัลลภาทิพย์. 2540. การศึกษา จุลนศาสตร์และสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ทางการค้า. รายงานการวิจัย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- ตมาลีตา ยวอมรพิทักษ์ และ จำไพ เกณฑ์สาธุ. 2537. การผลิตแซนแทนกัมโดย *Xanthomonas campestris*. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตมหาสารคาม.
- ธัญยาภรณ์ นาวินวรณ. 2542. การผลิตแซนแทนกัมจากกากมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ภาวิณี โลหะนะ. 2524. การผลิตและการใช้ประโยชน์ของแซนแทนกัม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปราณี อ่านเป็รื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหารตอนที่ 1. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศศิธร โชติศศิธร. 2535. การผลิตแซนแทนกัม ด้วยเครื่องชีวปฏิกรณ์แบบฟองอากาศจากสายพันธุ์คัดเลือก *Xanthomonas campestris*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทย. 2537. เอกสารครบรอบ 18 ปี สมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทย. กรุงเทพมหานคร: สมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทย.

- สุดจิตต์ พรหมจิตติพงศ์ และ เอี่ยมอนงค์ เขิงชัยชนะวงษ์. 2537. การศึกษาสมบัติบางประการของ Maltodextrin ที่มีค่า DE ต่ำจากแป้งมันสำปะหลัง. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อรนุช เผ่าจินดา. 2540. การผลิตแซนแทนกัมจากแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร. รายงานการวิจัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.
- อำนวย เวืองกิจฉนิทกุล. 2531. การเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์กลูโคสไมเลสด้วยกระบวนการอุทราฟิเลตรชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต. คณะวิศวกรรมศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

### ภาษาอังกฤษ

- Adam, M. 1953. Amylase: their kinds and properties and factors which influence their activity. Food Technology 7(53): 35-38.
- Amanullah, A., Satti, S., and Nienow, A. W. 1998. Enhancing xanthan fermentations by different modes of glucose feeding. Biotechnology Progress 14: 265 – 269.
- Amanullah, A., Serrano, C. L., Castro, B., Garlindo, E., Nienow, A. W. 1998. Influence of agitator type in pilot scale xanthan fermentations. Biotechnology and Bioengineer 57: 95-108.
- Anonymous. 1974. Xanthan gum offers versatility, safety. Food Technology 28(6): 10-21.
- AOAC. 2000. Official Method of Analysis. 17<sup>th</sup> ed. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists International.
- Asim, K. J., and Ghosh, P. 1999. Effect of citric acid on the biosynthesis and composition of xanthan. Journal of General Apply Microbiology 45: 115 – 120.
- Baig, S., Qadeer, M. A., Akhtar, M. S., and Ahmed, T. 1990. Utilization of unhydrolysed cheese whey for the production of extracellular polysaccharides by *Xanthomonas cucurbita* PCSIR B-52. Journal of Fermentation and Bioengineering 69: 345-349.

- Baird, J. K., and Pettitt, D. J. 1991. Biogum used in food and made by fermentation. In I. Goldberg, and R. Williams (eds.), Biotechnology and food ingredients, pp. 223-241. USA: Van Nostrand Reinhold.
- Betz, D. A. 1979. Xanthan gum a biosynthetic polysaccharide for the food industry. Food Technology. In Australia. 31, 1(January):11 – 16.
- Cadmus, M. C., Kuntson, C. A., Lagoda, A. A., Pittsley, J. E., and Burton, K. A. 1978. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermenters. Biotechnology and Bioengineer 20: 1003-1014.
- Callet, F., Milas, M., and Rinaudo, M. 1987. Influence of acetyl and pyruvate contents on rheological properties of xanthan gum in dilute solution. International Journal of Biological Macromolecules 9: 291-293.
- Casas, J. A., Santos, V. E., and Garcia-Ochoa, F. 2000. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. Enzyme and Microbial Technology 26: 282-291.
- Davidson, I. W. 1978. Production of polysaccharide by *Xanthomonas campestris* in continuous culture. FEMS Microbial Letter 3: 247-349.
- Davidson, L. R. 1980. Handbook of water – soluble gums and resins. New York: McGraw – Hill.
- De Vuyst, L., Van Loo, J., and Vandamme, E. J. 1987. Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. Journal of Chemistry Technology Biotechnology 39: 263 – 273.
- Dobois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. Analytical Chemistry 28(3): 350-356.
- Dziedzic, S. Z. and Kearsley, M. W. 1984. Glucose syrup: science and technology. New York: Elsevier Science.
- Flores, F., Torres, L. G., Garlindo, E. 1994. Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *Xanthomonas campestris* on the production and quality of xanthan gum. Journal of Biotechnology 34: 165-173.

- Funahashi, H., Machara, M., Taguchi, H., and Yoshida, T. 1987. Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. Journal of Chemistry Engineering Japan 65: 603 – 606.
- General Mill Chemical, Inc. (n.d.). Galaxy XB Xanthan Gum. Litho U.S.A. A3052 Rev 5/76.
- Godet, P. 1973. Fermentation of polysaccharide gums. Process Biochemistry 8: 33-34.
- Gonzales, R., Johns, M. R., Greenfield, P. F. and Pace, G. W. 1989. Xanthan gum precipitation using ethanol. Process Biochemistry 24: 200-203.
- Harding, E. N., Cleary, M. J., and Ielpi, L. 1995. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In Y. H. Hui, and G. K. George (eds.), Food Biotechnology : Microorganisms. pp. 495-514. New York: VCH.
- Herbst, H., Suh, I. S., Peter, H. U., Schumpe, A., and Deckwer, W. D. 1989. Comparison of various fermenter types used for production of xanthan. DECHEMA biotechnology conference 3, Part A, pp. 495-498. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Jacob, B. M., and Genstein, J. M. 1960. Handbook of microbiology. New York: Academic Press.
- Jana, K. A., and Ghosh, P. 1995. Xanthan biosynthesis in continuous culture: Citric acid an energy source. Journal of Fermentation Bioengineering 80(5): 485-491.
- Jansson, P. E., Kenne, L., and Lindberg, B. 1975. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Carbohydrate Research 45: 275-282.
- Kennedy, J. F., and Brandshaw, L. J. 1984. Production, properties and applications of xanthan. Progress in Industrial Microbiology 19: 12-19.
- Kleinitz, W., Littmann, W., and Herbst, H. 1989. Screening of xanthan-biopolymer for a high salinity oil reservoir. Proceedings of the Fifth European Symposium on Improved Oil Recovery, 25-27 April 1989. pp. 1-9. Budapest, Hungary.
- Kovacs, P. 1973. Xanthan gum, a new and unique colloidal stabilizer for the brewery industry. Food Trade Review 43(11): 17-22.
- Lee, H. L. 1981. Concentrated xanthan gum solutions. U.S. Patent 4,299,825.

- Lilly, V. G., Wilson, H. A., and Leach, J. G. 1958. Bacterial polysaccharide II. laboratory-scale production of polysaccharide by species of *Xanthomonas*. Applied Microbiol 6: 105-108.
- Lo, Y. M., Yang, S. T., and Min, D. B. 1997. Effect of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. Applied Microbiology Biotechnology 47: 689 – 694.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biology Chemistry 193: 265-275.
- McNeely, W. H. 1966. Process for producing *xanthomonas* hydrophilic colloid. U.S. patent. 3, 232, 929.
- McNeely, W. H. 1968. Process for producing a polysaccharide. U.S. patent. 3, 391, 060.
- McNeely, W. H. 1969a. Process for producing a polysaccharide. U.S. patent. 3, 427, 226.
- McNeely, W. H. 1969b. Process for producing a polysaccharide. U.S. patent. 3, 433, 708.
- Moorhouse, R., Walinshaw, M. D., and Arnott, S. 1977. In P. Sandford, and A. Laskin (eds.), Extracellular Microbial Polysaccharides ACS Symposium Series 45, pp. 9-12. Washington, DC.: American Chemical Society.
- Moraine, R. A., and Rogovin, P. 1966. Kinetics of polysaccharide B – 1459 fermentation. Biotechnology and Bioengineering 8: 511 – 524.
- Moraine, R. A., and Rogovin, P. 1971. Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control. Biotechnology and Bioengineering 34: 1392-1397.
- Moreno, J., Lopez, M.J., Vargas – Garcia, C., and Vazquez, R. 1998. Use of agricultural wastes for xanthan production by *Xanthomonas campestris*. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology 21: 242 – 246.
- Morris, E. R. 1977. Molecular origin of xanthan solution properties. In P. A. Sandford, and A. Laskin (eds.), Extracellular Microbial Polysaccharides ACS Symposium Series 45, pp. 81-89. Washington, DC: American Chemical Society.

- Peter, H. U., Herbst, H., Heselink, P. G. M., Lundorf, H., Schumpe, A., and Deckwer, W. D. 1989. The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. Biotechnology and Bioengineering 34: 1393–1397.
- Pettitt, D. J. 1978. Xanthan gum. In J. M. V. Blanshard, and J. R. Mitchell (eds.), Polysaccharide in Food, pp. 263–282. London: Butterworths.
- Pinches, A., and Pallent, L. J. 1986. Rate and yield relationships in the production of Xanthan Gum by batch fermentation using complex and chemically defined growth media. Biotechnology and Bioengineering 18: 1484–1496.
- Rajeshwari, K. V., Prakash, G., and Ghosh, P. 1995. Improved process for xanthan production using modified media and intermittent feeding strategy. Letter in Applied Microbiology 21, 3 (September) 173–175 .
- Robyt, J. F., and Whelan, W. J. 1965. Anomalous reduction of alkaline 3,5-dinitrosalicylate by oligosaccharide and its bearing on amylase studies. Journal of Biochemistry 95: 10P-11P.
- Rocks, J. K. 1971. Xanthan Gum. Food Technology 25(5): 467–483.
- Rodriguez, H., and Aguilar, L. 1997. Detection of *Xanthomonas campestris* mutants with increased xanthan production. Journal of Industry Microbiology 18: 232–234.
- Rogovin, S. P., Anderson, R. F., and Cadmus, M. C. 1961. Production of polysaccharide with *Xanthomonas campestris*. Journal of Biochemistry Microbial Technology Engineering 3(1): 51-63.
- Roseiro, J. C., Esgalhado, M. E., Collaco, M. T., and Emery, A. N. 1992. Medium development for xanthan production. Process Biochemistry 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. Journal of Applied Bacteriology 75: 381-386.
- Salam, M. H., Fadel, M. A., and Murad, H. A. 1994. Bioconversion of sugarcane molasses into xanthan gum. Journal of Biotechnology 33: 103–106.



- Sanchez, A., Ramirez. M. E., Torres, L. G., and Galindo, E. 1997. Characterization of xanthans from selected *Xanthomonas* strains cultivated under constant dissolved oxygen. World Journal of Microbiology and Biotechnology 13: 443-451.
- Sanford, 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 P. A. Sanford, and A. Laskin (eds.), Extracellular Microbial Polysaccharides ACS Symposium Series 45, pp. 195-209. Washington, D.C.: American Chemical Society.
- Shatwell, K. P., and Sutherland, I. W. 1990. The influence of acetyl and pyruvate substituents on the helix-coil transition behaviour of xanthan. Carbohydrate Research 206: 87-103.
- Souw, P., and Demain, A. L. 1979. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Applied and Environmental Microbiology 37(6): 1186-1192.
- Sutherland, I. W. 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. London: Cambridge University Press.
- Sutherland, I. W. 1993. Xanthan. In J. G. Swings, and E. L. Civerolo (eds.), Xanthomonas, pp. 363-382. London: Chapman & Hall.
- Sutherland, I. W. 1994. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. Biotechnology Advance 12: 393-448.
- Swings, J. G., and Civerolo, E. L. 1993. Xanthomonas. London: Chapman & Hall.
- Underkofler, L. A. 1954. Industry fermentation: Fungal amylolytic enzymes. New York: Academic Press.
- Vashitz, O., and Sheintuch, M. 1991. Analysis of polymer synthesis rate during steady state growth of *X. campestris*. Biotechnology and Bioengineering 37: 383-385.
- 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. Journal of Chemistry Technology and Biotechnology 39: 263-273.

- Wernau, W. C. 1979. Fermentation process for production of xanthan. U.S. patent 4.282.321.
- Whistler, R. L. and Bemiller, J. N. 1973. Industrial gums. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Academic Press.
- Zhao, X., Nienow, A. W., Kent, C. A., Chatwin, A., and Galindo, E. 1991. In M. Bruxelmane, and G. Froment (eds.), Procc. 7<sup>th</sup> European Conference on Mixing, pp. 277 – 283. Belgium: Brugge.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหารแข็งสูตร YM (Yeast malt Extract) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ

|                       |         |           |
|-----------------------|---------|-----------|
| กลูโคส                | 10      | กรัม      |
| ยีสต์สกัด             | 3       | กรัม      |
| มอลต์สกัด             | 3       | กรัม      |
| เปปโตน                | 5       | กรัม      |
| วุ้นผง                | 15      | กรัม      |
| น้ำกลั่น              | 1,000   | มิลลิลิตร |
| ค่าความเป็นกรด - ต่าง | 7.0±0.2 |           |

## 2. อาหารเหลวสูตร YM (Yeast malt Extract) สำหรับเตรียมหัวเชื้อ

|                       |         |           |
|-----------------------|---------|-----------|
| กลูโคส                | 10      | กรัม      |
| ยีสต์สกัด             | 3       | กรัม      |
| มอลต์สกัด             | 3       | กรัม      |
| เปปโตน                | 5       | กรัม      |
| น้ำกลั่น              | 1,000   | มิลลิลิตร |
| ค่าความเป็นกรด - ต่าง | 7.0±0.2 |           |

## 3. อาหารเลี้ยงเชื้อของ Roseiro (Roseiro et al.,1992) สูตรปรับปรุง (ธัญยาภรณ์ นาวินวรรณ, 2542)

|                            |           |    |
|----------------------------|-----------|----|
| กลูโคส                     | 30        | g  |
| แอมโมเนียมซัลเฟต           | 1         | g  |
| กรดบอริก                   | 0.0072    | g  |
| เฟอร์ริกคลอไรด์            | 0.0042    | g  |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต | 7.2       | g  |
| แคลเซียมคาร์บอเนต          | 0.029     | g  |
| แมกนีเซียมซัลเฟต           | 0.1       | g  |
| ซิงค์ออกไซด์               | 0.006     | g  |
| กรดซิตริก                  | 2         | g  |
| น้ำกลั่น                   | 1,000     | ml |
| ค่าความเป็นกรด-ต่าง        | 7.0 ± 0.2 |    |

## ภาคผนวก ข.

### วิธีวิเคราะห์

1. การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNSA (3,5-dinitrosalicylic acid) (Robyt and Whelan, 1965)

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล
2. เตรียมสารละลาย DNSA โดยละลาย 3,5 - dinitrosalicylic acid 2.5 กรัม ลงใน 50 มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล และเติมโซเดียมโพแทสเซียมทราเทรท 75 กรัม คนจนละลาย เติมน้ำให้ได้ ปริมาตรสุดท้าย 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

#### วิธีการ

1. นำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรมาเติมสารละลาย DNSA 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน
2. ต้มในน้ำเดือด 10 นาที
3. ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว แล้วเติมน้ำ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
5. คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จาก standard curve ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0-1 กรัมต่อลิตร เป็นสารมาตรฐาน

2. การวัดปริมาณ Total carbohydrate ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric Reagent (Dobois et al., 1956)

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

#### วิธีการ

1. นำสารละลายตัวอย่าง มา 0.5 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาทีจึงเขย่า
4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 20 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
6. คำนวณปริมาณ Total carbohydrate จาก standard curve ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0-0.1 กรัมต่อลิตร เป็นสารมาตรฐาน

### 3. การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry method (Lowry et al., 1951)

#### สารเคมี

- 1% Potassium Sodium Tartrate จำนวน 1 ลิตร  
ซึ่ง Potassium Sodium Tartrate 10 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่น ให้ความร้อนจนสารละลายหมด ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร
- 0.1 N NaOH จำนวน 1 ลิตร  
ซึ่ง NaOH 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนเป็น 1,000 มิลลิลิตร
- Lowry Reagent  
Reagent A : ซึ่ง  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20 กรัม ละลายใน 0.1 N NaOH ปรับปริมาตรจนเป็น 1,000 มิลลิลิตร  
Reagent B : ซึ่ง  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  5 กรัม ละลายในสารละลาย 1% potassium sodium tartrate ปรับปริมาตรจนเป็น 1,000 มิลลิลิตร  
Reagent C : ผสม Reagent A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับ Reagent B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- Folin reagent  
เตรียมโดยผสม Folin 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 5 ส่วน

#### วิธีการ

1. ปิเปตตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองและใส่ Reagent C ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
2. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
3. เติมสารละลาย Folin reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร
6. คำนวณปริมาณโปรตีนจาก standard curve ซึ่งใช้ Bovine serum albumin ความเข้มข้น 0-0.1 กรัมต่อลิตร เป็นสารมาตรฐาน

### 4. การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Micro Kjeldahl Analysis (AOAC, 2000)

#### อุปกรณ์

Gerhardt Kjeldatherm Digestion unit และ Gerhardt Vapodest

#### สารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
3. สารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 เปอร์เซนต์
4. สารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์

5. คะตะลิสต์ (ส่วนผสมของโปตัสเซียมซัลเฟต 10 กรัม และ คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม)
6. อินดิเคเตอร์ (สารละลายเมทิลเรดและสารละลายโบรโมครีซอลกรีนใน แอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในอัตราส่วน 1:5)

#### วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างมา 2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. ใส่ antibumping ลงไป 2-3 เม็ด เติมกะตะลิสต์ 1 กรัม
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 4 มิลลิลิตร ย่อยประมาณ 2-3 ชั่วโมง จนตัวอย่างใสเป็นสี เหลืองอ่อนหรือไม่มีสี
4. ทิ้งให้เย็น แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
5. ทำการกลั่น โดยต่อ Kjeldahl flask เข้ากับเครื่อง Vapodest รองรับสารที่กลั่นได้ด้วย กรดบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งเติมอินดิเคเตอร์ลงไปแล้ว 3-4 หยด
6. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงใน Kjeldahl flask กลั่นจนขวดรองรับมีสารละลาย 250 มิลลิลิตร
7. นำสารละลายที่กลั่นได้ในขวดรองรับไปไตเตรทด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีแดง
8. คำนวณปริมาณไนโตรเจนและปริมาณโปรตีน

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{กรดซัลฟิวริกที่ใช้ไตเตรท(มล.)} \times 0.1 \times 1.4}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

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

#### 5. การวัดหาปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

##### วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 2-5 กรัม ใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแล้ว
2. นำเข้าอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
3. ทิ้งให้เย็นใน desiccator
4. ชั่งน้ำหนักและคำนวณความชื้นจาก

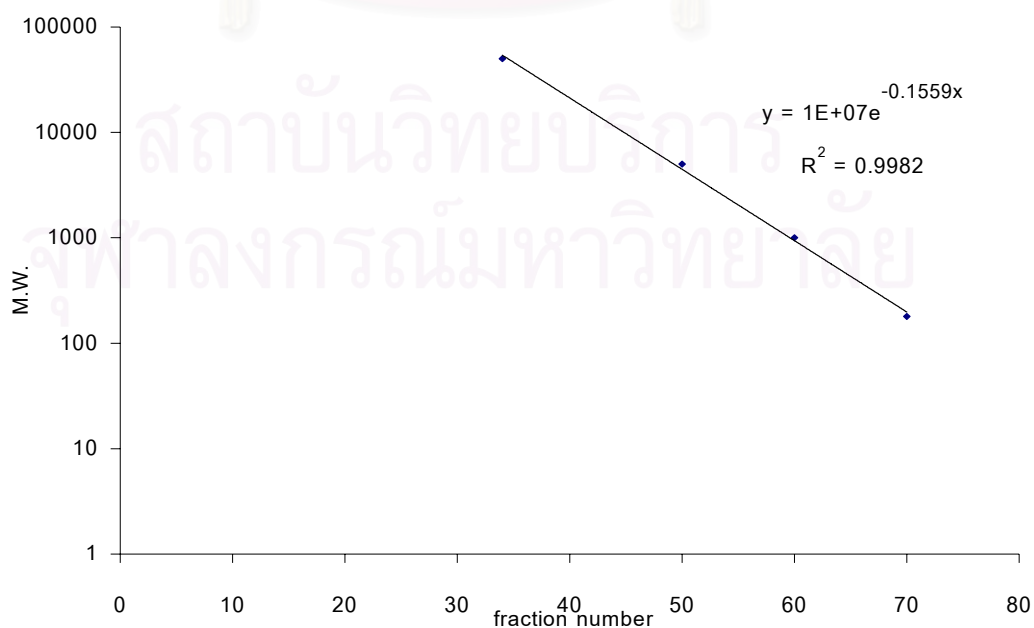
$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{[\text{น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลังอบ (กรัม)}] \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)}}$$

## 6. การวัดปริมาณ crude xanthan ในน้ำหมัก

นำน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* TISTR 840 ที่ชั่วโมงการเลี้ยงต่าง ๆ บั่นแยกเซลล์ออกที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนสารโพลีแซคคาไรด์โดยใช้ปริมาตร 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอลต่อน้ำหมัก 2:1 นำเอา crude xanthan ที่ตกตะกอนออกมาได้ไปอบแห้งที่ 55 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน นำเข้า desiccator จนเย็น จากนั้นจึงชั่งน้ำหนัก

## 7. การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography

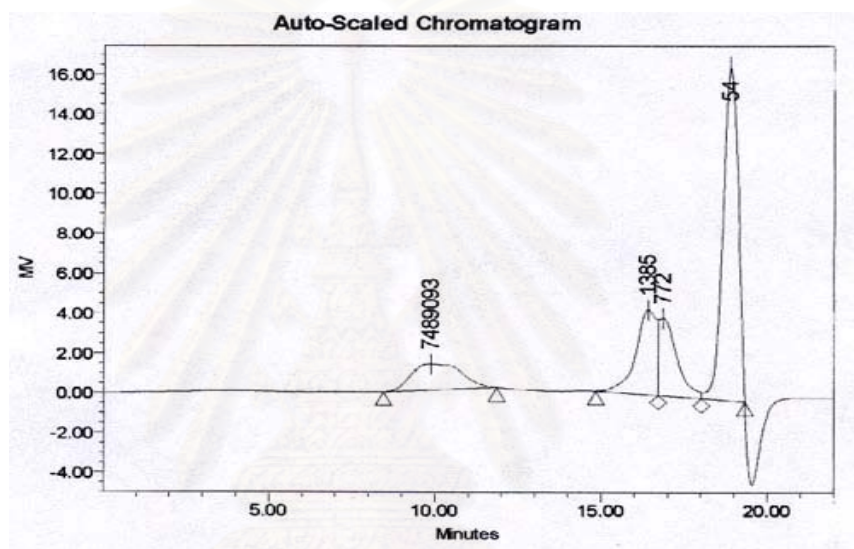
การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้วิธี Gel Permeation Chromatography ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด Sephacryl<sup>®</sup> 200 HR และใช้สารละลายโซเดียมอะซิเตท ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.2 เป็นสารละลายตัวพา ฉีดสารละลายเดกซ์แทรนมาตรฐาน (M.W. เท่ากับ 50,000 5,000 และ 1,000) และกลูโคส (M.W. 180) ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 15 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ไหลผ่านคอลัมน์ออกมาทุก ๆ 2 มิลลิลิตรมาทำการตรวจหาปริมาณ total carbohydrate และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง fraction number กับ น้ำหนักโมเลกุล เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับหาน้ำหนักโมเลกุลของไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ดังรูป



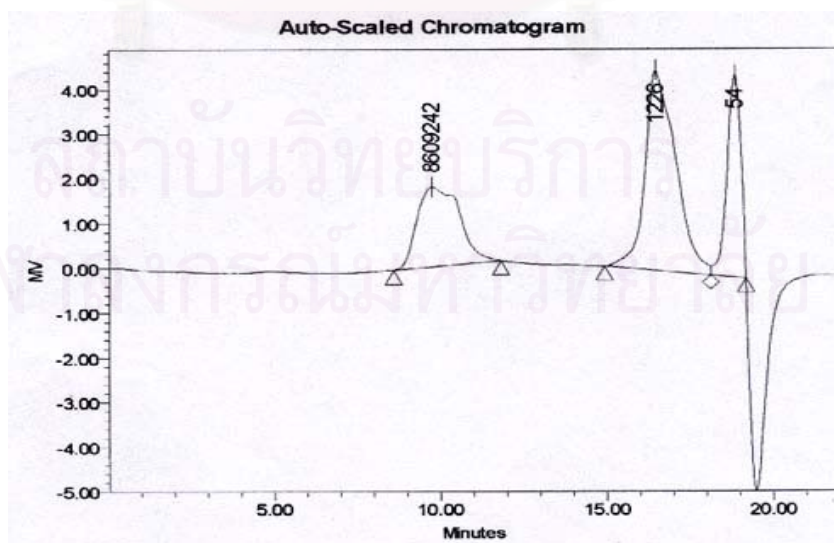


## 8. การหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของแซนแทนด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography

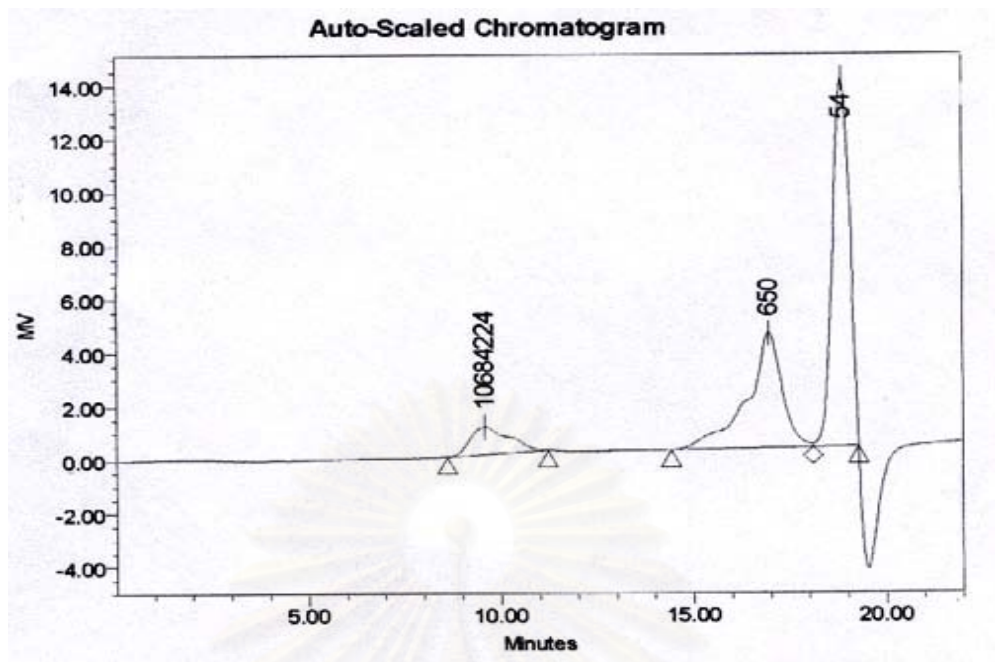
นำสารละลายแซนแทนกัมเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.4 ไมครอน จากนั้นนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลด้วย Gel Permeation Chromatography โดยใช้คอลัมน์ชนิด Ultrahydrogel linear (MW resolving range = 1,000-20,000,000) ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์เป็นสารละลายตัวพา โดยใช้อัตราเร็ว 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการตรวจวัดด้วยคลื่นแสงอินฟราเรดโดยใช้สารพลาสม่าเป็นสารมาตรฐาน (วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการโครมาโตกราฟีงานบริการทางเทคนิค ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ)



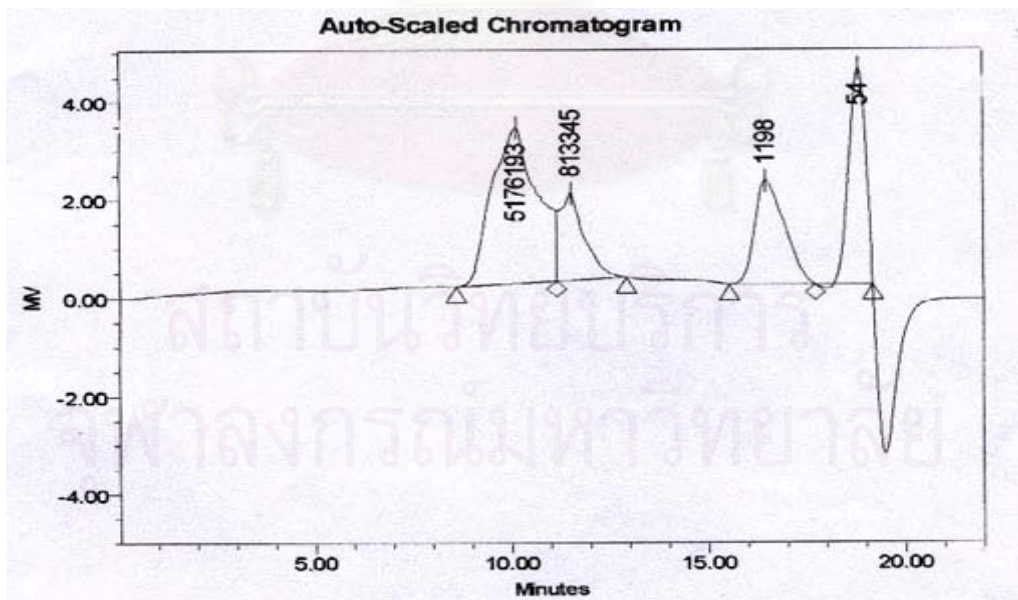
รูปที่ 34 Chromatogram แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ crude xanthan (B1) วิเคราะห์โดย Gel Permeation Chromatography



รูปที่ 35 Chromatogram แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ crude xanthan (B2) วิเคราะห์โดย Gel Permeation Chromatography



รูปที่ 36 Chromatogram แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ crude xanthan (T3) วิเคราะห์โดย Gel Permeation Chromatography



รูปที่ 37 Chromatogram แสดงน้ำหนักโมเลกุลของแซนแทนกัมเกรดอาหาร Satiaxane™ CX 91 วิเคราะห์โดย Gel Permeation Chromatography

## ภาคผนวก ค

### ข้อมูลผลิตภัณฑ์

#### 1. BAN 480 L

##### Description

BAN - Bacterial Amylase Novo - is an alpha-amylase produced by submerged fermentation of a selected strain of *Bacillus myloliquefaciens*. The systematic name is 1,4- $\alpha$ -D-glucan glucono-hydrolase (EC 3.2.1.1.).

BAN is an endo-amylase. It hydrolyzes 1,4- $\alpha$ -glucosidic linkages in amylose and amylopectin at random, which results in a rapid reduction of the viscosity and of gelatinized starch. The breakdown products are dextrans of differing chain lengths, and oligosaccharides.

##### Specification

##### Appearance

The liquid products (L) are brown preparations with densities around 1.2 g/ml.

The micrigranulate (MG) is a free-flowing, non-dusting granulate with an average particle size around 300 microns.

##### Product types

BAN is available in the following standard strengths:

|                 |                 |           |
|-----------------|-----------------|-----------|
| Liquid:         | BAN 480 L.....  | 480 KNU/g |
|                 | BAN 240 L.....  | 240 KNU/g |
| Microgranulate: | BAN 800 MG..... | 800 KNU/g |

##### Activity determination

A detailed description of Novo Nordisk's analytical method is available on request.

### Packing

Liquid BAN is available in 250-kg steel drums and 30-kg jerry cans.

The microgranulate is available in 40-kg fibre drums.

### Storage

When BAN is stored at a temperature of 25°C, the declared activity is maintained for at least six months. When stored at 5 °C, the product will maintain the declared activity for at least one year.

### Approval Status

BAN is produced according to FAO/WHO JECFA and FCC recommendations for food grade enzymes, supplemented with maximum limits of  $5 \times 10^4$ /g for total viable counts and  $10^2$  /g for moulds. GRAS petition is filed.

### Safety

Enzymes are proteins, and inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reaction in sensitized individuals.

Some enzymes may irritate skin, eyes and mucous membranes upon prolonged contact.

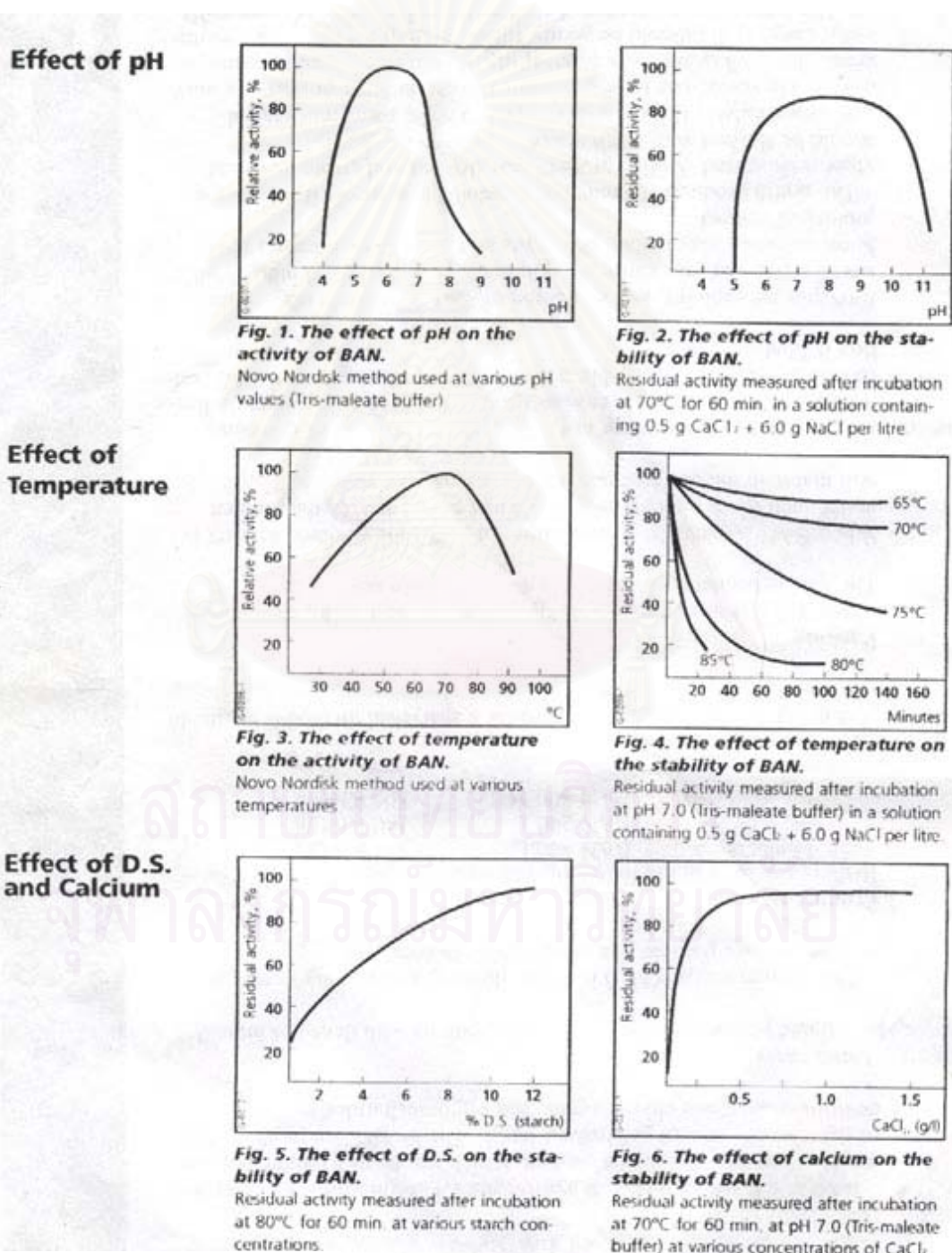
The liquid products (L) may create inhalable aerosols if splashed or vigorously stirred. Spilled product may dry out and create dust, and should be flushed away with water.

Microgranulates (MG) are developed to resist some mechanical effects. However, excessive mechanical wear and tear or crushing may create dust. All spills, even small spills, should be cleaned up immediately. Large spills should be gently shovelled into plastic lined containers. Use respiratory protection. Small spills and remains of large spills should be removed by vacuuming or flushing with water (no splashing). Vacuum cleaners and central vacuum systems should be equipped with

HEPA filters. Material safety Data Sheets and leaflets "How to handle liquid Novo Nordisk enzymes-safely" and "How to handle powder/grunulated enzymes-safely" are available on request.

### Applications

Ban is conventional  $\alpha$ -amylase operating in the relatively high temperature range 70-90 °C. BAN is used in the starch, alcohol and paper industries.



## 2. AMG E

### Description

AMG E is an amyloglucosidase (glucoamylase) preparation produced by a Genetically modified strain of *Aspergillus niger*. The systematic name is 1, 4-alpha-D-glucan glucohydrolase (EC 3.2.13).

### Production

#### Appearance

### Specification

AMG E is a brown liquid preparation with a density of approx. 1.2 g/ml.

#### Packing

AMG E is available in jerry cans with 25 litres, in steel drums with 210 litres, in Schutz containers with 1,000 litres, and in bulk-truckloads.

### Application

AMG E hydrolyses 1, 4-as well as 1,6-alpha linkages in liquiefied starch. During hydrolysis, the amyloglucidase activity removes glucose units in a stepwise manner from the non-reducing end of the substrate molecule.

AMG E is free from transglucosidase activity, which could otherwise result in formation of panose and isomaltose, by transfer of glucosyl moieties from 1,4-alpha to a 1,6-alpha position, which again would result in a lower glucose yield.

As shown in fig.1 an increase of 0.2-0.3% DX is achieved with AMG E compared to AMG 300 L. This means that AMG E can replace e.g. Dextrozyme 225/75 L in some process.

### Reaction

For long reaction times (40-100 hours) such as for production of

### Parameters

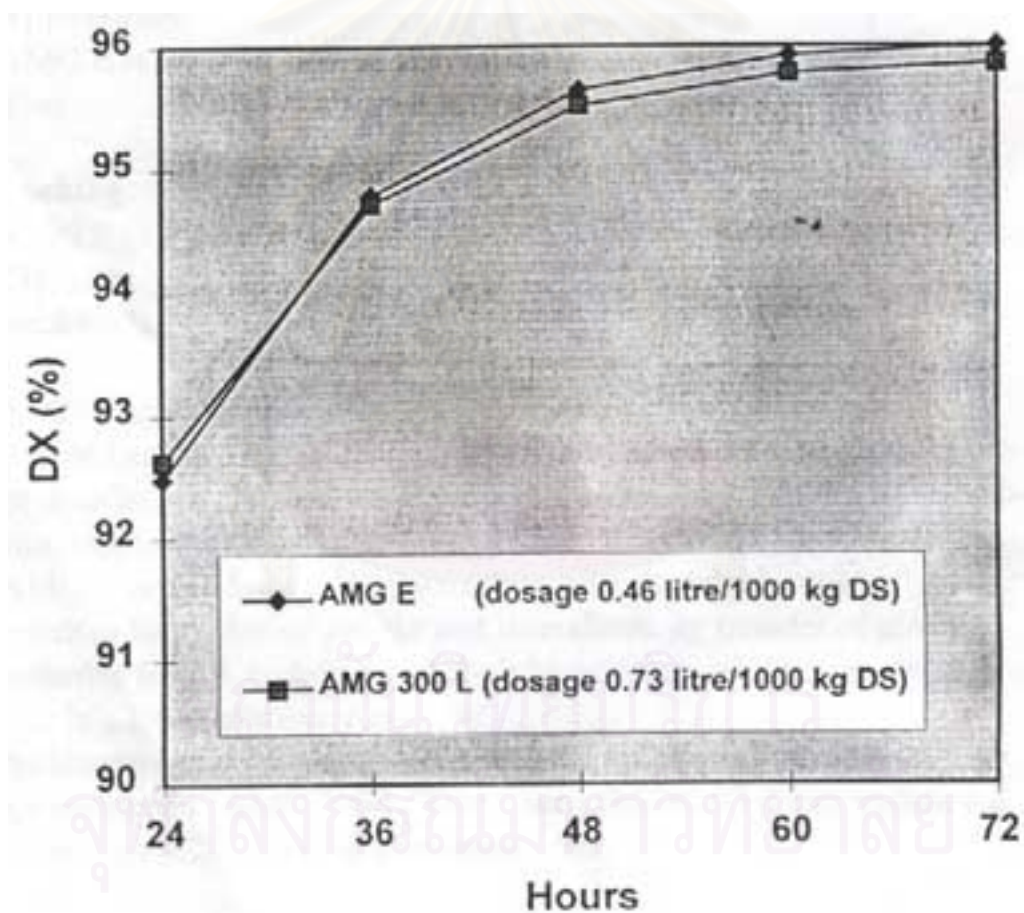
high dextrose syrup, the recommended optimum conditions are pH 4.1 - 4.3 and 60 - 62°C.

### Dosage

AMG E is 75-80% stronger than AMG 300 L. As shown in fig. 1, 95.6% Dextrose (DX) can be achieved in 48 hours by a dosage of 0.46 litre AMG E/1,000 kg DS under recommended optimum conditions and 30% DS. For comparison, a dosage of 0.73 litre AMG 300 L will give the same DX, but in 54 hours. In order to reach this DX in 48 hours, the dosage should be 0.82 litre.

Figure 1:

AMG E compared to AMG 300 L



### 3. Satiaxane™ CX 91

#### Properties

##### Dispersion

To disperse the product without lumps :

- premix the powder with the other dry ingredients,
- or, disperse it in a non-solvent medium (oil, alcohol),  
and pour the preparation into the liquid whilst stirring. Continue stirring to obtain a complete dispersion

##### Dissolution

The dissolution of the product depends on the medium and the process : it is improved by heat treatment (time, temperature), shear-stress (propeller, exchanger, homogenizer). A complete dissolution can be obtained in cold conditions.

##### Media / Uses

The product can be used in aqueous, dairy, or fruit media, with various total solid contents. The maximum dosage is about 1.5 %, according to the medium and the required final texture.

#### Description

Satiaxane™ CX 91 is a food additive used as a texturant. It is a thickener particularly suited to various food applications.

The product conforms to the FAO/WHO, EEC, FDA (Code of Federal Regulations) and the Food Chemical Codex standards. However, we recommend that the user ensures that this product is in compliance with the local regulations in force, particularly in the country where the product is to be consumed.

The product consists of : Xanthan Gum



**Characteristics****Rheology**

Viscosity in a 1% aqueous solution (+1% KCl) : 1200-1600 cP measured on a Brookfield LVF viscometer, spindle N° 3, 60 rpm.

**PH**

6.5 to 8.5 measured in a 1% aqueous solution

**Aspect, Flavour**

A creamy-white to light-brown powder, of neutral odour and flavour.

**Particle size**

At least 98% less than 75 microns (ASTM screen N° 200)

**Loss on drying**

Not more than 14%

**Bacteriological**

Total plate count : Not more than 2000 per gram

Yeast and Molds : Not more than 200 per gram

Pathogenic bacteria (*E. coli*, *Salmonella*) : Negative by tests

**Packaging and Storage**

25 kg. Net cartons lined with a polyethylene bag. Store away from heat and moisture, preferably at 15-25 °C (59-77°F) and at about 65% relative humidity. This product, when stored in the previously mentioned conditions and in its original unopened packaging, will maintain its initial properties for at least 2 years.

**4. Sephacryl® 200 HR**

Product Number: S-200-HR

Product Name: Sephacryl® 200 HR

Synonyms: Poly([allyl dextran]-co-N,N--methylenebisacrylamide)

Sephacryl® S-200

EG/EC Number: EINECS

MDL number: MFCD00165824

CAS Number: 65546-95-4

MDL Number: MFCD00165824

EC Number: EINECS

**Storage Temp:** 2-8°C

**Comments:**

Aqueous ethanol suspension, 25-75 µm (wet), Fractionation range 1,000-80,000 Da,  
Fractionation range 5,000-250,000 Da

**Physical form:** Suspension in 20% ethanol

**Application:** For gel filtration.

**Features and benefits:** The HR grades are smaller particle sizes with narrower size distributions optimized for more efficient separations and faster flow.

Cross-linked co-polymer of allyl dextran and N,N $\phi$ -methylenebisacrylamide.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ง

## การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % การใช้น้ำตาลรีดิวิซ์เมื่อสิ้นสุดการหมักของการหมักแบบขั้นตอนเดียวโดยแปรความเร็วรอบในการกวนให้อากาศเป็นแบบต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 609.831        | 2  | 304.916     | 30.275 | .000 |
| Within Groups  | 90.643         | 9  | 10.071      |        |      |
| Total          | 700.474        | 11 |             |        |      |

ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % crude xanthan เมื่อสิ้นสุดการหมักของการหมักแบบขั้นตอนเดียวโดยแปรความเร็วรอบในการกวนให้อากาศเป็นแบบต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 0.335          | 2  | 0.167       | 4.528 | 0.044 |
| Within Groups  | 0.333          | 9  | 3.697E-02   |       |       |
| Total          | 0.668          | 11 |             |       |       |

**ตารางที่ 20** ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % น้ำตาลรีดิวซ์ที่เข้าไปเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 2.193          | 2  | 1.097       | 2.632 | .126 |
| Within Groups  | 3.750          | 9  | .417        |       |      |
| Total          | 5.944          | 11 |             |       |      |

**ตารางที่ 21** ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % cell dry weight เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 3.428E-03      | 2  | 1.714E-03   | 10.322 | .005 |
| Within Groups  | 1.495E-03      | 9  | 1.661E-04   |        |      |
| Total          | 4.923E-03      | 11 |             |        |      |

**ตารางที่ 22** ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของความหนืดน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 136.452        | 2  | 68.226      | 3.524 | .074 |
| Within Groups  | 174.235        | 9  | 19.359      |       |      |
| Total          | 310.687        | 11 |             |       |      |

- ตารางที่ 23** ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % น้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 94 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 1835.838       | 2  | 917.919     | 22.371 | .000 |
| Within Groups  | 369.282        | 9  | 41.031      |        |      |
| Total          | 2205.120       | 11 |             |        |      |

- ตารางที่ 24** ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % cell dry weight เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 94 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 8.483E-02      | 2  | 4.242E-02   | 52.676 | .000 |
| Within Groups  | 6.442E-03      | 8  | 8.052E-04   |        |      |
| Total          | 9.127E-02      | 10 |             |        |      |

- ตารางที่ 25** ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของความหนืดของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 94 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 13425.682      | 2  | 6712.841    | 113.784 | .000 |
| Within Groups  | 530.965        | 9  | 58.996      |         |      |
| Total          | 13956.647      | 11 |             |         |      |

**ตารางที่ 26** ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของ % crude xanthan เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 94 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 3.214          | 2  | 1.607       | 193.605 | .000 |
| Within Groups  | 6.640E-02      | 8  | 8.301E-03   |         |      |
| Total          | 3.280          | 10 |             |         |      |

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสายศิริ ศิลปวุฒิ เกิดเมื่อวันที่ 7 พฤศจิกายน พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดจันทบุรี สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) เมื่อปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อใน ระดับปริญญาโทในหลักสูตรสาขาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย